



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PŘÍPRAVA OLIGOSACHARIDŮ HYALURONANU S N-ACETYLGLUKOSAMINEM NA OBOU KONCÍCH ŘETĚZCE S VYUŽITÍM ENZYMOVÉ KATALÝZY

PREPARATION OF HYALURONAN OLIGOSACCHARIDES WITH N-ACETYLGLUCOSAMINE AT
BOTH ENDS OF THE CHAIN USING ENZYMATIC CATALYSIS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MARTINA GADOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Tereza Šílová

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0928/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Martina Gadová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	Ing. Tereza Šílová	
Konzultanti:	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. Ing. Vojtěch Enev	

Název bakalářské práce:

Příprava oligosacharidů hyaluronanu s N-acetylglukosaminem na obou koncích řetězce s využitím enzymové katalýzy

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat literární přehled následující problematiky: enzymatické štěpení hyaluronanu, vlastnosti beta-glukuronidázy, charakteristika a stanovení struktury oligosacharidu hyaluronanu.
2. Stanovit teplotní a pH optimum vybrané komerční beta-glukuronidázy.
3. Připravit oligosacharidy hyaluronanu se strukturou (GlcNAc-GlcA)_n-GlcNAc s využitím enzymu beta-glukuronidázy.
4. Charakterizovat získané oligosacharidy vhodnými analytickými metodami.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Martina Gadová
Student(ka)

Ing. Tereza Šílová
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Predložená bakalárska práca sa zaoberá prípravou nepárnych oligosacharidov hyaluronanu s *N*-acetylglukozamínom na oboch koncoch reťazca s využitím katalýzy pomocou enzýmu β -Glukuronidázy.

Teoretická časť je zameraná na doterajšie poznatky o kyseline hyalurónovej a jej oligosacharidoch. Venuje sa vlastnostiam, enzymatickej hydrolýze, využitiu v rôznych odvetviach ale aj analýze oligosacharidov. Jedna kapitola je venovaná aj vlastnostiam enzýmu β -Glukuronidáza. Experimentálna časť je venovaná príprave oligosacharidov typu HA^{NN}. Boli optimalizované podmienky prípravy tohto oligosacharidu HA (pH, teplota) a priebeh enzymatickej hydrolýzy a zloženia zmesi i po degradácií bol monitorovaný metódou UHPLC-UV. Po optimalizácii sa pripravila zmes oligosacharidov HA^{NN} oligosacharidov a následne bola analyzovaná metódami UHPLC-UV a LC-MS.

Všetky dáta boli namerané v spoločnosti Contipro Pharma, a.s., Dolní Dobrouč, Česká republika.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with preparation of odd-numbered hyaluronan oligosaccharides with *N*-acetylglucosamine at both ends of the chain using enzymatic catalysis by β -Glucuronidase.

The theoretical part focuses on present knowledge of hyaluronic acid and its fragments. It focuses on properties, enzymatic hydrolysis, application in different branches of science, but also analysis of oligosaccharides. One chapter is devoted to properties of enzyme β -Glucuronidase. The experimental part deals with preparation of oligosaccharides type HA^{NN}. The reaction conditions for preparation of HA oligosaccharides were optimized (pH, temperature) and the progress of enzymatic hydrolysis and the mixture composition after digestion were monitored by method UHPLC. After optimization the mixture of oligosaccharides HA^{NN} was prepared and consequently it was analysed by methods UHPLC and LC-MS.

All the data were acquired in company Contipro Pharma, a.s., Dolní Dobrouč, Czech republic.

KĚÚČOVÉ SLOVÁ

kyselina hyalurónová, HA, oligosacharidy, optimalizácia, pH, teplota, UHPLC, LC-MS

KEYWORDS

hyaluronic acid, HA, oligosaccharides, optimization, pH, temperature, UHPLC, LC-MS

GADOVÁ, M. *Příprava oligosacharidů hyaluronanu s N-acetylglukosaminem na obou koncích řetězce s využitím enzymové katalýzy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Tereza Šílová.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Rada by som poďakovala Ing. Tereze Šílovej (rodenej Ehlovej) za odborné vedenie, vynaložený čas, pomoc, cenné rady, pripomienky a trpezlivosť pri spracovávaní bakalárskej práce, Mgr. Petre Liškovej a Ing. Dagmar Čožikovej, Ph.D. za pomoc a cenné rady pri meraní a spracovávaní experimentálnych dát.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cieľ práce.....	7
3	Teoretická časť.....	8
3.1	Charakteristika kyseliny hyalurónovej	8
3.1.1	História	8
3.1.2	Štruktúra kyseliny hyalurónovej	8
3.1.3	Izolácia a výroba HA.....	10
3.2	Degradácia kyseliny hyalurónovej	11
3.2.1	Špecifická degradácia HA katalyzovaná enzýmami	11
3.2.2	Vlastnosti β -glukuronidázy	13
3.3	Typy oligosacharidov HA	15
3.4	Laboratórna príprava oligosacharidov HA	17
3.5	Analýza oligosacharidov HA.....	18
3.5.1	Kvapalinová chromatografia	18
3.5.2	Kapilárna elektroforéza	20
3.5.3	Nukleárna magnetická rezonancia	21
3.6	Využitie oligosacharidov hyaluronanu	21
4	Experimentálna časť	23
4.1	Chemikálie.....	23
4.2	Prístroje.....	23
4.3	Metódy a postupy	24
4.3.1	Príprava oligosacharidov hyluronanu s N-acetylglukozamínom na oboch koncoch reťazca s využitím enzýmovej katalýzy	24

4.3.2	Príprava zmesi oligosacharidov hyaluronanu s N-acetylglukozamínom na oboch koncoch reťazca s využitím enzýmovej katalýzy	25
4.3.3	Analýza produktov po enzymatickej hydrolýze.....	25
4.3.4	Identifikácia vybraných vzoriek pomocou LC-MS.....	26
5	Výsledky	28
5.1	Optimalizácia podmienok degradácie β -Glukuronidázou	28
5.1.1	Optimalizácia teploty	28
5.1.2	Optimalizácia pH.....	30
5.1.3	Analýza pripravených oligosacharidov HA ₉ ^{NN} pomocou UHPLC a LC-MS	31
5.1.4	Príprava zmesi oligosacharidov hyaluronanu s N-acetylglukozamínom na oboch koncoch reťazca s využitím enzýmovej katalýzy	34
6	Diskusia.....	37
7	Záver	40
8	Použitá literatúra	41
9	Zoznam použitých skratiek	46

1 ÚVOD

Od čias kedy dostala kyselina hyalurónová svoj názov od Karla Meyera a Johna Palmera sa stala už predmetom mnohých výskumov a v dnešnej dobe taktiež pritiahla pozornosť širokej verejnosti najmä v oblasti kozmetiky. Vďaka svojim výborným vlastnostiam ako sú napríklad biokompatibilita, biodegradabilita, schopnosť naviazať veľké množstvo vody a mnohým ďalším biologickým vlastnostiam má táto látka široké uplatnenie vo farmaceutickom, lekárskom a kozmetickom priemysle. Aj napriek mnohým výskumom, ktoré už prebehli, je kyselina hyalurónová a jej fragmenty veľmi atraktívnou látkou, ktorá na poli výskumu nekončí. Vedci mnohých výskumných tímov sa snažia odhaliť jej vlastnosti, ktoré by poskytlí kyseline hyalurónovej a jej fragmentom ďalšie uplatnenie či už v kozmetickom alebo medicínskom odvetví.

Motiváciou pre tvorbu tejto bakalárskej práce bolo optimalizovať podmienky prípravy nepárnych oligosacharidov HA s *N*-acetyl-D-glukozamínom na oboch koncoch, ktoré nie sú komerčne dostupné. Pripravené vzorky oligosacharidov môžu slúžiť ako materiál pre ďalšie chemické derivatizácie alebo biologické testovanie.

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom teoretickej časti bakalárskej práce je zoznámiť sa s vlastnosťami kyseliny hyalurónovej a spôsobmi jej degradácie s dôrazom na enzymatickú katalýzu vedúcu k vzniku rôznych typov oligosacharidov.

Cieľom experimentálnej časti je zistiť optimálne podmienky pre prípravu nepárnych oligosacharidov hyaluronanu typu HA^{NN}, pripraviť zmes týchto oligosacharidov a pomocou vhodných analytických metód potvrdiť ich štruktúru.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Charakteristika kyseliny hyalurónovej

3.1.1 História

V roku 1934, Karl Meyer a jeho kolega John Palmer izolovali jedinečný glykozamínoglykán z hovädzieho sklovca a pomenovali ho kyselina hyalurónová (HA). Toto slovo pochádza s gréckeho slova hyalos, čo znamená sklo, a uronic, ktoré je anglicky názov pre urónovú kyselinu [1].

Počas 30. a 40. rokov 20. storočia bola HA izolovaná z mnohých zdrojov ako napríklad synoviálna tekutina, pupočná šnúra, sklovec, koža, kohúti hrebeň a tiež zo streptokokov [2]. Kyselina hyaluronová bola prvýkrát komerčne použitá v 1942, keď Endre Balazs požiadal o patent na použitie HA ako náhradu vaječného bielka v pekárenských výrobkoch [3].

Fyzikálno-chemická charakterizácia HA bola vykonaná počas 50. a 60. rokov 20. storočia tímom Karla Meyera. Kyselina hyalurónová bola prvýkrát izolovaná v kyslej forme, ale počas ďalšieho výskumu bolo zistené, že sa prirodzené vyskytuje ako soľ – hyaluronát sodný [1]. Obe formy HA sú v dnešnej dobe označované termínom „hyaluronan“.

Prvé medicínske použitie hyaluronanu je datované do 50. rokov 20. storočia. Pri plastickej operácii oka bola HA použitá ako náhrada sklovca [3].

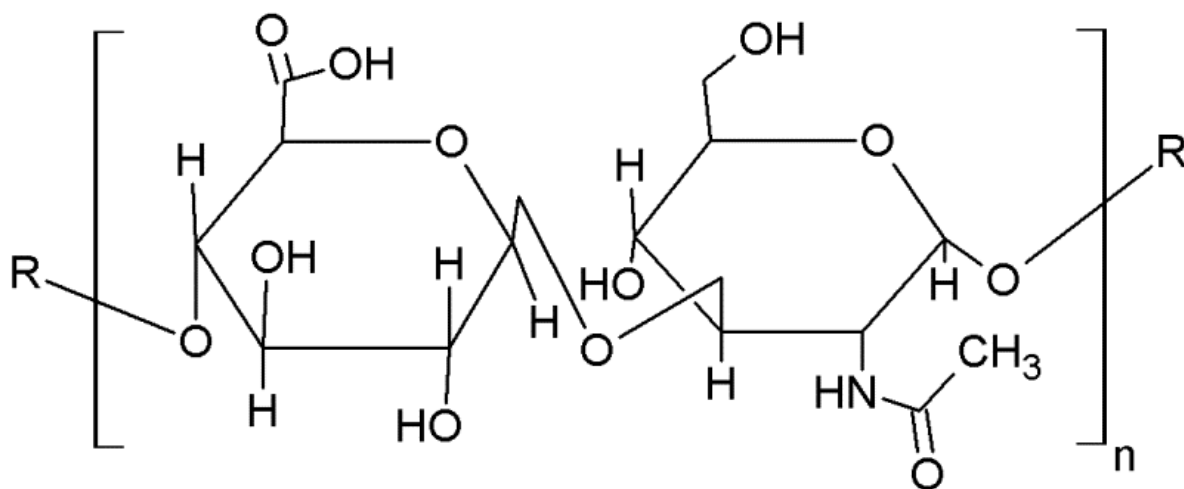
V roku 1972, Hardingham a Muir objavili, že hyaluronan interaguje s chrupavkovými proteoglykánmi a slúži ako hlavný štruktúrny reťazec chrupavky [2]. To bol prvý príklad špecifickej interakcie medzi hyaluronanom a proteínom a mnoho ďalších interakcií bolo objavených počas deväťdesiatych rokov [2].

Po roku 1980 sa výskumom štruktúry, metabolizmu a biologických vlastností HA začali zaoberať mnohé vedecké tímy po celom svete. Dlhú dobu sa predpokladalo, že biosyntéza hyaluronanu prebieha obdobným spôsobom ako u ostatných zástupcov skupiny proteoglykanov, teda syntézou za účasti Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula vo vnútri bunky [2]. Neskôr sa ukázalo, že HA je syntetizovaná na vnútornej strane plazmatickej membrány za účasti membránového proteínu hyaluronansyntázy (HAS), odkiaľ sa vylučuje do extracelulárnej matrix [2]. V týchto rokoch Balazs začal ponúkať kyselinu hyalurónovú pre medicínske účely a vyrábal prípravky, ktoré boli protizápalové a o vysokej viskozite a ponúkal ich ako viskózný výživový doplnok pre pacientov s osteoartrózou a tiež ako pomocu pri očných operáciách [2].

3.1.2 Štruktúra kyseliny hyalurónovej

Kyselina hyalurónová je nevetvený polysacharid, ktorého štruktúra je tvorená opakujúcimi sa disacharidovými jednotkami, ktoré sú spojené glykozidickou väzbou β -1,4. Disacharidové

jednotky sú zložené z kyseliny glukurónovej a *N*-acetyl-D-glukozamínu spojené väzbou β -1,3, vid' Obrázok 1. Každá disacharidová jednotka má molekulovú hmotnosť $397 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Oba sacharidy priestorovo vychádzajú z glukózy, ktoré v konfigurácii beta umožňujú objemným skupinám (karboxylové, acetamidové, hydroxylové) byť v stéricky priaznivejšej ekvatoriálnej pozícii, zatiaľ čo všetky malé atómy vodíka obsadzujú menej výhodné axiálne polohy [4]. To znamená, že štruktúra disacharidu je veľmi stabilná [4]. Sacharidové jednotky zaujímajú stabilnú stoličkovú konformáciu, ktorá určuje konformáciu polyméru v roztoku.

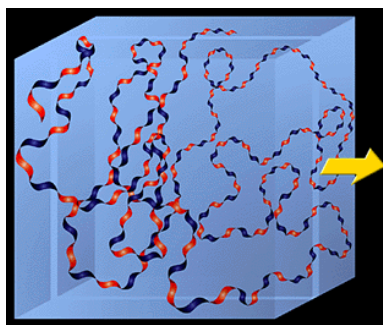


Obrázok 1 Primárna chemická štruktúra kyseliny hyalurónovej

Natívny hyaluronan je polymér s vysokou molekulovou hmotnosťou, tvorený polydisperznou zmesou reťazcov, ktoré obsahujú 2 000–25 000 disacharidových jednotiek [5].

Terciárna štruktúra je stabilizovaná interakciami medzi hydrofóbnymi časťami a intermolekulárnymi vodíkovými väzbami medzi acetamínovými a karboxylovými skupinami [6].

Vo fyziologickom roztoku je terciárna štruktúra reťazca molekuly HA definovaná štruktúrou disacharidov, vnútornými vodíkovými mostíkmi a interakciami s rozpúšťadlom [4]. Axiálne atómy vodíka tvoria nepolárny, relatívne hydrofóbny povrch, a rovníkové postranné reťazce tvoria polárne, hydrofilné povrchy, čo umožňuje vytvoriť stočenú pásovú štruktúru [4]. V dôsledku toho molekula HA zaujíma štruktúru náhodne rozbaleného klobka, vid' Obrázok 2.



Obrázok 2 Model štruktúry Ha v roztoku [4]

Takáto štruktúra má dôležitý význam pre transport molekúl v roztoku. Malé molekuly ako voda, živiny a elektrolyty môžu voľne difundovať cez rozpúšťadlo do štruktúry, avšak veľké molekuly ako proteíny budú čiastočne vylučované zo štruktúry kvôli ich hydrodynamickej veľkosti v roztoku [4].

3.1.3 Izolácia a výroba HA

Priemyselná výroba kyseliny hyaluronovej je založená na dvoch hlavných procesoch, extrakcia zo živočíšnych tkanív a mikrobiálna fermentácia pomocou bakteriálnych kmeňov. Obidve tieto technológie produkujú polydisperzný hyaluronan o vysokej molekulovej hmotnosti ($M_w \geq 1 \cdot 10^6$ Da) pre biomedicínske a kozmetické aplikácie [7].

Významnými živočíšnymi zdrojmi HA sú najmä kohútie hrebene, ľudská pupočná šnúra alebo sklovec oka, viď kapitola 3.1.1., napriek tomu v súčasnej dobe sa izolácia HA zo živočíšnych tkanív prakticky nepoužíva, predovšetkým kvôli etickej otázke. Ďalšími nevýhodami sú časová i finančná náročnosť a nedostatočné výťažky.

Hyaluronan vyrobený pomocou baktérií je totožný ako hyaluronan vyizolovaný zo živočíšnych tkanív a navyše nie je imunogénny, preto je výborným zdrojom hyaluronanu pre medicínske aplikácie [7]. Extrakcia hyaluronanu z mikrobiálnej fermentačnej pôdy je pomerne jednoduchý proces s vysokými výťažkami a navyše mikrobiálne kmene môžu byť fyziologicky alebo metabolicky prispôsobené k produkcii väčšieho množstva hyaluronanu o vyššej molekulovej hmotnosti [7].

Najčastejšími bakteriálnymi producentmi HA sú zástupcovia rodu *Streptococcus* [8]. Ako prvý boli k priemyselnej produkcii HA využité kmene *S. equi* a *S. zooepidemicus* [9]; [8].

Kultivácia bakteriálnych kmeňov sa vykonáva v režime kontinuálnej kultivácie, pretože poskytuje hneď niekoľko výhod. Rast buniek môže byť udržiavaný v exponenciálnej fáze, pretože bolo dokázané, že syntéza hyaluronanu sa zastaví v stacionárnej fáze [7]. Suboptimálne podmienky môžu byť vyvolané limitovaním živín, aby sa znížilo súperenie medzi rastom buniek a syntézou hyaluronanu [7]. Fáze obratu sa zabraňuje použitím kontinuálnej kultúry a navyše viskozita bujónu môže byť riadená koncentráciou hyaluronanu,

čím sa zlepši prenos hmoty v reaktore [7]. Vďaka bakteriálnej produkcii dosiahli výťažky HA 6–7 g.l⁻¹, čo umožňuje výrobcom dosiahnuť produkciu niekoľko ton HA ročne.

Sľubným organizmom pre výrobu HA je geneticky modifikovaný kmeň *B. subtilis* [10]. Výhodou použitia *B. subtilis* ako hostiteľského mikroorganizmu je, že neprodukuje endotoxíny ani exotoxíny [10]. Vďaka tomu nemusí byť produkt zložito purifikovaný. Navyše tento kmeň je veľmi dobre charakterizovaný, tiež je kultivovateľný vo veľkom meradle a neprodukuje hyaluronidázu, ktorá môže byť príčinou degradácie produktu [10]. Veľkou výhodou tohto kmeňa je aj schopnosť rásť na minimálnom médiu, na rozdiel od zástupcov rodu *Streptococcus* [10].

3.2 Degradácia kyseliny hyalurónovej

Pri degradácii hyaluronanu sa znižuje jeho molekulová hmotnosť v dôsledku štiepenia väzieb polyméru. Degradčné reakcie je možné rozdeliť na základe ich mechanizmu do dvoch skupín.

Prvou skupinou sú reakcie nešpecifické, u ktorých nie je možné presne lokalizovať miesto na polyméri, kde štiepenie prebehne. Nešpecifické reakcie sú spravidla vyvolané pôsobením vonkajších fyzikálnych vplyvov, medzi ktoré patrí napr. ultrazvuk, voľné radikály, vysoké teploty, kyseliny, zásady, mikrovlnné žiarenie atď. [11]; [12]; [13]. Náhodným spôsobom štiepenia vzniká zmes fragmentov HA, ktorú je možné len ťažko charakterizovať a jednotlivé fragmenty izolovať. Z toho dôvodu je použitie takejto zmesi obmedzené.

Do druhej skupiny patria reakcie, pri ktorých je štiepený konkrétny typ väzby, preto sú nazývané špecifické. Tento typ reakcií je spravidla katalyzovaný enzýmami, vid' kapitola 3.2.1.

3.2.1 Špecifická degradácia HA katalyzovaná enzýmami

Hyaluronidázy sú skupina enzýmov, ktoré degradujú prevažne kyselinu hyalurónovú [11]. Väčšina skupín enzýmov štiepi β -1,4 glykozidickú väzbu [14]. Pomenovanie pre tieto enzýmy je z časti zavádzajúce, pretože väčšina z týchto enzýmov má obmedzenú schopnosť degradovať taktiež chondroitín a sulfáty chondroitínu [11]. Prokaryotické aj eukaryotické lyázy majú schopnosť degradovať obe tieto triedy substrátov a iba niektoré bakteriálne enzýmy majú absolútnu špecifitu pre kyselinu hyalurónovú [11]. Medzi tieto triedy s absolútnou špecifitou patri aj trieda prokaryotických hyaluronidáz a sú to enzýmy zo *Streptomyces hyalurolyticus* [11]. Pretože má úplnú špecifitu voči HA, používa sa pre štruktúrne štúdie [11].

Klasifikácia hyaluronidáz do troch hlavných skupín bola zostavená Meyerom v sedemdesiatych rokoch [15].

Hyaluronidázy spadajú do troch tried založených na analýze produktov reakcie:

- 1) Bakteriálne hyaluronidázy sú endo- β -acetyl-hexosaminoxidázy (EC 4.2.2.1)
- 2) Typ hyaluronidáz endo- β -glukoronidázy (EC 3.2.1.36) nachádzajúci sa v slinných žľazách pijavíc, kôrovcov, niektorých parazitov
- 3) Cicavčie hyaluronidázy sú endo- β -acetyl-hexoaminidázy (EC 3.2.1.35), sú prítomné v cicavčích spermiách, lyzozómoch, v jedoch blankokrídlavcov, hadoch [16]; [17].

Vo všeobecnosti sú hyaluronidázy extrahované z hovädzieho dobytku, semenníkov oviec a z baktérií [18]. Pre liečebné účely sa môžu využívať len enzýmy o vysokej čistote, najčastejšie cudzorodé, nežiaduce aktivity sú proteolitické a glukuronidázové [18].

Prvá skupina enzýmov fungujú ako eliminázy, ktoré vyvolávajú β -elimináciu glykozidickej väzby, vytvárajú nenasýtenú väzbu na novom neredukujúcom konci a sú špecifické iba pre kyselinu hyalurónovú [14]. Hlavným konečným produktom degradácie touto skupinou enzýmov sú disacharidy [16]. Boli izolované z rôznych mikroorganizmov, napríklad *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces* [19].

Druhá skupina hyaluronidáz generuje tetra- a hexasacharidy (HA^{NA}) [16]. Táto skupina na rozdiel od väčšiny hyaluronidáz štiepi β -1,3-glykozidickú väzbu [14]. Ich mechanizmus pôsobenia sa podobá viac eukaryotickým alebo stavovcovým enzýmom ako bakteriálnym enzýmom, pretože využívajú mechanizmus hydrolýzy [14].

Tretia skupina hyaluronidáz sú enzýmy, ktoré majú funkciu hydroláz, náhodne štiepia β -1,4-glykozidickú väzbu, kde prevládajúcim produktom sú tetrasacharidy (HA^{AN}) a nemajú špecifitu [14]; [16]; [18].

Hyaluronidázy v tkanivách stavovcov sú prítomné len v malých koncentráciách a majú vysoko špecifickú aktivitu, ktorá je nestabilná počas purifikácie vyžadujúcej neustálu prítomnosť detergentov a inhibítorov proteáz, no mnoho z týchto problémov už bolo vyriešených [13]. Hyaluronidázy sa úspešne používajú napríklad pri liečbe extravazácie [17].

Eukaryotné enzýmy

Medzi hlavné enzýmy zúčastňujúcich sa degradácie kyseliny hyalurónovej v ľudskom organizme patrí šesť enzýmov: HYAL-1, HYAL-2, HYAL-3, HYAL-4, HYAL-P1 (pseudo gén) a PH-20/SPAM1 [19]. HYAL-1 je zodpovedný za katabolizmus intracelulárnej HA a HYAL-2 je zodpovedný za katabolizmus HA v extracelulárnej oblasti a hlavnou úlohou enzýmu PH-20 je uľahčenie preniku spermií skrz oocyt bohatý na HA [19]. Pseudogén HYAL-P1 je prepisovaný, avšak mRNA obsahuje vnútorný stop kodón, ktorý má za následok neúspešnú transláciu [19]; [18].

Ďalší eukaryotný enzým je BTH (hovädzia testikuárna hyaluronidáza). Je to enzým štiepajúci β -1,4-glykozidickú väzbu v HA, chondroitíne, chondroitíne sulfáte [19]. Najkratším sacharidovým produktom enzymatického štiepenia HA pomocou BTH je HA_4 [20]. Stabilita väzby medzi HA_4 a enzýmom je nízka a preto nie je týmto enzýmom hydrolyzovaná

Hyaluronidáza vo včelom jede (BVH) je hyaluronát 4-glykanohydroláza [19]. Je jedným z hlavných alergénov prítomných vo včelom jede, ktorý špecificky degraduje kyselinu hyalurónovú v extracelulárnej matrici kože a to umožňuje jednoduchšie prenikanie zložiek jedu do tela [19].

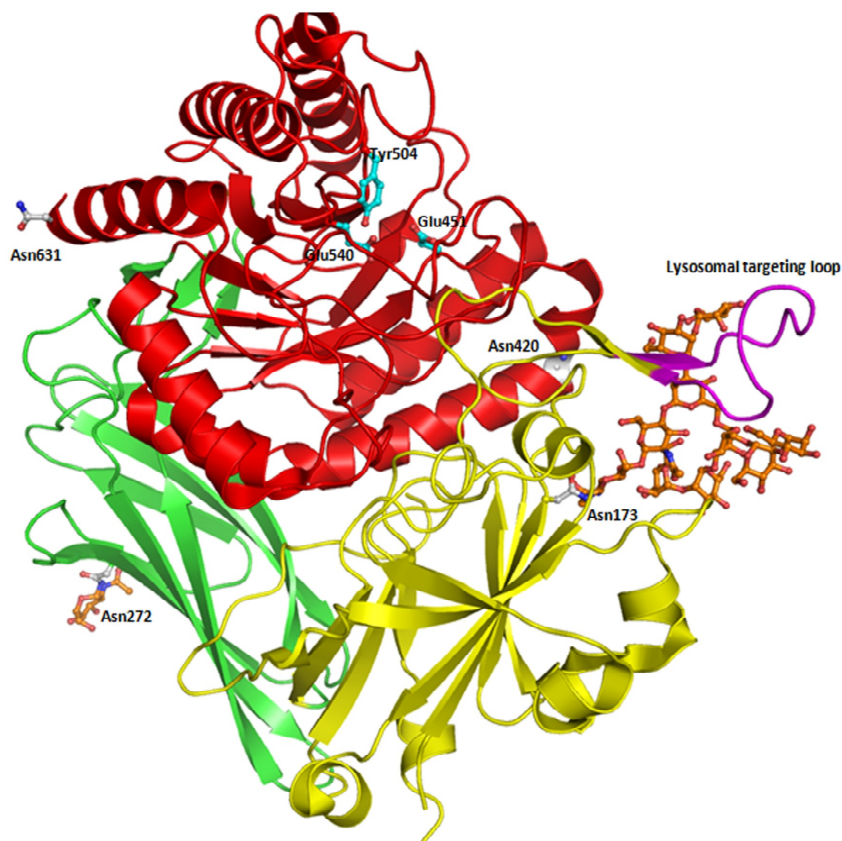
Všetky známe bakteriálne lyázy zdieľajú podstatnú sekvenčnú identitu a teda sa predpokladá, že majú podobný mechanizmus katalýzy [22]. Degradácia kyseliny hyaluronovej prebieha na β -1,4-glykozidickej väzbe a produkuje nenasýtený sacharid, ktorý má dvojité väzby medzi C4 – C5 [22]; [21]. Najznámejšie a najviac preskúmané bakteriálne hyaluronidázy sú *Streptococcus pneumoniae* a *Streptococcus agalactiae* [19]. *Streptococcus agalactiae* hyaluronidáza je enzým, ktorý pomáha prelomiť biofyzikálnu bariéru hostiteľskej bunky degradáciou HA a chondroitín sulfátu [22]. V baktérii je syntetizovaný v neaktívnej podobe a aktívna forma enzýmu sa objavuje až v extracelulárnej matrix kedy dôjde k odštiepeniu signálnej časti na N-konci [22].

Vo všeobecnosti platí, že hyaluronidázy rozkladajú vysokomolekulárnu kyselinu hyalurónovú na oligosacharidy a β -D-glukuronidáza pokračuje v tomto štiepení, kedy z týchto oligosacharidov odštiepuje sacharidové jednotky z neredukujúceho konca [3].

$$\begin{array}{c}
 \text{O} \\
 || \\
 \text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6 - \text{O}-\text{R} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\beta\text{-Glukuronidáza}} \text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6 + \text{R-OH} \\
 | \\
 \text{OH}
 \end{array}$$

Molekulová hmotnosť tohto enzýmu izolovaného z hovädzej pečene je 290,000 Da a sedimentačný koeficient je 14S, optimálne pH pre tento enzým má hodnotu 4,4 a izoelektrický bod má hodnotu 5.1 [25].

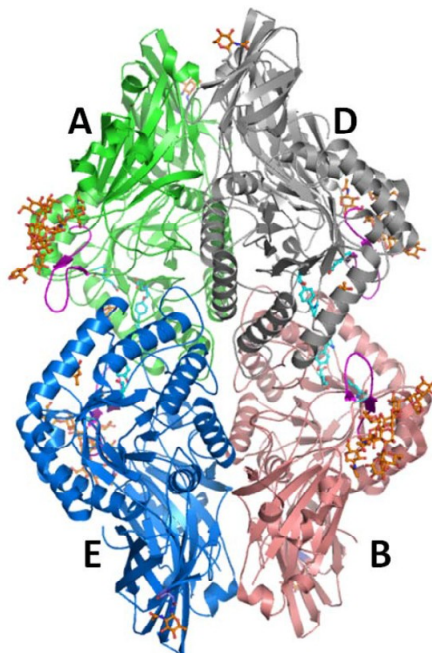
Polypeptid glukuronidázy obsahuje 629 zvyškov a 22 zvyškov dlhú signálnu sekvenciu [26]. Štruktúra monoméru obsahuje tri odlišné domény: gélová valcová štruktúra (zvyšky 22–223), imunoglobulínová oblasť konštantnej domény (zvyšky 224–342), TIM valcovitá doména [26], vid' Obrázok 4. Kryštál monoméru má rozmery $a = 93,98$, $b = 123,11$, $c = 266,11$ a $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ [26].



Obrázok 4 Štruktúra monoméru Glukuronidázy. Domény gélová valcová štruktúra, doména imunoglobulínovej konštantnej oblasti a TIM valcová doména sú zobrazené žltou, zelenou a červenou farbou. Zvyšky podieľajúce sa na katalýze sú zobrazené zelenomodrou farbou [26].

Funkčná forma ľudskej β -glukuronidázy tvorí až tetramér zo štyroch identických podjednotiek monoméru, ktoré sú spojené nekovalentnými interakciami, štruktúra vid' Obrázok 5 [26]. Veľkosť takéhoto tetraméru je 75 000 Da [26]. Elektrónová hustota na glykanových reťazcoch je pozorovaná na každom monomére na dvoch miestach [26]. Vysoká elektrónová hustota sa nachádza medzi Asp362 príľahlých monomérov, obklopená štyrmi molekulami vody a je formovaná ako sodíkové ióny [26][25]. V blízkosti rozhrania medzi A–E a B–D sú lokalizované nezávislé aktívne miesta [26].

V štúdií, po porovnaní štruktúry ľudskej GUS a bakteriálnej GUS zistili, že ich štruktúry sú takmer identické [26]. Líšia sa v lyzozomálnom zacielení a v slučke v okolí aktívneho miesta bakteriálnej GUS [26]. Táto slučka nie je prítomná u ľudskej β -Glukuronidázy, u baktérií je tvorená 17 zvyškami a ukazuje na interakciu s inhibítorom [26].



Obrázok 5 Celková štruktúra ľudskej β -Glukuronidázy. Podjednotky A, B, D, E sú príslušne znázornené zelenou, červenou, sivou a modrou farbou [26].

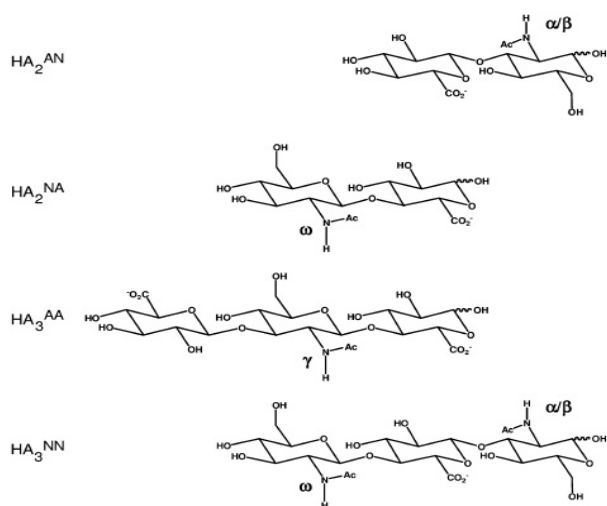
Purifikácia β -Glukuronidázy prebieha v niekoľkých krokoch a je potrebné prihliadať pri výbere purifikačných metód na zachovanie čo najväčšej enzýmovej aktivity. Jedna z metód používa ako prvý krok purifikácie inkubáciu surového pečeneového homogenátu pri 37 °C po dobu 11 dní, ktorá odstráni značné množstvo bielkovín bez výraznej inaktívácie enzýmu [27]. Purifikačná metóda podľa Himena poukazuje na to, že nie je nutná inkubácia pečeneového homogenátu [25]. β -Glukuronidázu je možné purifikovať síranom amónnym, frakcionáciou etanolom, frakcionáciou organickými rozpúšťadlami, gélovou filtráciou a izoelektrickou fokusáciou, kedy posledný krok vedie k oddeleniu dvoch foriem enzýmu [25].

β -Glukuronidáza sa významne podieľa na katabolizme kyseliny hyalurónovej v bunkách. Podieľa sa spolu s HYAL-2 a N-acetylglukozaminidázou na degradácii fragmentov HA v lyzozómoch až na malé monosacharidy, ktoré potom difundujú do cytoplazmatického priestoru [17].

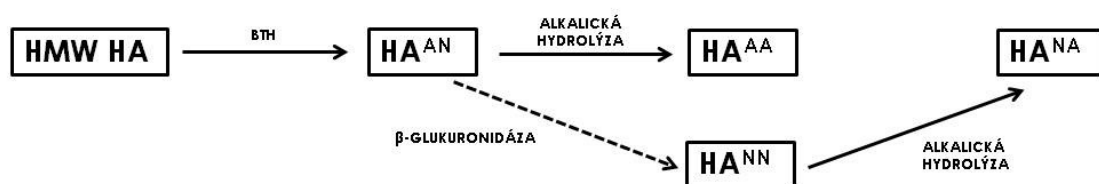
3.3 Typy oligosacharidov HA

Oligosacharidy hyaluronanu môžu mať na svojich koncoch buď kyselinu glukuronovú (A) alebo N-acetylglukozamín (N). Z toho vyplýva, že existujú nasledujúce varianty: AN, AA, NA

a NN, vid' Obrázok 6. HA^{AA} a HA^{NN} patri medzi nepárne oligosacharidy zatiaľ čo HA^{AN} a HA^{NA} sú párne oligosacharidy. Párne oligosacharidy s GlcNAc na redukujúcom konci (HA^{AN}) môžu byť pripravené degradáciou vysokomolekulárnej HA pomocou hovädzej testikulárnej hyaluronidázy pri 37 °C [28]. Nepárne oligosacharidy s GlcNAc na redukujúcom a neredukujúcom konci (HA^{NN}) môžu byť vytvorené odstránením neredukujúceho koncového kruhu pomocou β -glukuronidázy pri 37 °C z oligosacharidov pripravených degradáciou testikulárnou hyaluronidázou [28]. Na prípravu nepárnych oligosacharidov s GlcA na oboch koncoch (HA^{AA}) je mnohokrát používaná alkalická β -eliminácia, kedy sa odstráni koncový redukujúci kruh [28]. Alkalické podmienky pre priebeh reakcie sa vytvoria pomocou NaOH a reakcia sa ukončí neutralizáciou s HCl [28]. Párne oligosacharidy s GlcA na redukujúcom konci a GlcNAc na neredukujúcom konci (HA^{NA}) je možné pripraviť alkalickou degradáciou HA^{NN} typu oligosacharidov, ktoré boli predtým prečistené [28]. U všetkých typov prípravy oligosacharidov, kde sa využíva enzymatická degradácia je možné na ukončenie reakcie použiť prevarenie vzorky vo vriacej vode po dobu 3–5 minút, kedy dôjde k denaturácii enzýmu [28]. Schému prípravy rôznych typov oligosacharidov vid' Obrázok 7.



Obrázok 6 Rôzne typy oligosacharidov podľa cukrov nachádzajúcich sa na redukujúcom a neredukujúcom konci [28]



Obrázok 7 Schéma prípravy rôznych typov oligosacharidov kyseliny hyalurónovej. Prerušovaná čiara znázorňuje reakciu, ktorá je predmetom tejto bakalárskej práce

3.4 Laboratórna príprava oligosacharidov HA

Degradáciou vysokomolekulárnej kyseliny hyalurónovej dochádza k vzniku zmesi oligosacharidov o rôznej molekulovej hmotnosti. Mnohokrát je nutné jednotlivé oligosacharidy zo zmesi oddeliť, či už pre analýzu alebo prípravu konkrétnych oligosacharidov. Pri voľbe separačnej metódy sa vychádza z vlastností oligosacharidov – sú záporne nabité, majú rovnakú sekvenciu a odlišujú sa dĺžkou reťazca. Práve kvôli týmto vlastnostiam sa z techník pre analýzu oligosacharidov, ktoré boli popísané za posledných 15 rokov, zdajú najslubnejšie gélová a kvapalinová chromatografia (GPC, LC) [29].

Po mnohé roky boli oligosacharidy delené pomocou GPC a detekované napríklad analýzou kyseliny urónovej [30]. GPC je schopná oddeliť oligosacharidy až do 23 disacharidových jednotiek, avšak je to časovo náročná metóda [30]. Najčastejšie sú používané gélové sorbenty na báze zosieťovaného polyakrylamidu (Bio-Gel) [31]. Gélová permeačná chromatografia môže byť použitá aj ako počiatočný krok purifikácie vo veľkom meradle oligosacharidov HA [32].

Pre separáciu HA oligosacharidov boli tiež používané metódy vysokovýkonnej kvapalinovej chromatografie (HPLC), vrátane na normálnych a prevrátených fázach a aniónvýmennej chromatografie [30]. Pomocou aniónvýmennej chromatografie s UV detekciou je možné separovať OHA až do približne 20 disacharidových jednotiek, čím je táto metóda vhodná pre analytické a semipreparatívne účely [33]. Prvú separáciu pomocou iónovýmennej chromatografie popísal Weissmann a spol. [29]. V kyseline hyalurónovej a jej oligosacharidoch sa nenachádzajú žiadne fluorofory a z tohto dôvodu sa najobvyklejšie vykonáva fotometrická detekcia pri 210 nm. Najbežnejšie sa používa lineárny gradient mobilnej fázy ako napríklad fosforečnan sodný, no lepšia separácia nižších oligomérov bola dosiahnutá gradientom mobilnej fázy octanu sodného [33]. Je výhodnejšie použitie mobilných fáz o nižších pH pretože je známe, že cukry s 2-acetamidovou skupinou vedľa glykozidickej

väzby v polohe 3 sú nestabilné pri podmienkach s vysokým pH a taktiež použitím podmienok s nižším pH sa urýchli separácia [31]. Vhodné stacionárne fázy pri iónovovýmennej chromatografii sú amínom modifikované stacionárne fázy, ktoré sú v kyslom pH protonované [34].

3.5 Analýza oligosacharidov HA

3.5.1 Kvapalinová chromatografia

Pojem chromatografia naznačuje, že sa jedná o separačnú metódu, pri ktorej nastáva priestorové oddelenie zložiek analyzovanej zmesi v dôsledku ich nerovnomerného putovania v prostredí [35]. Toto prostredie vytvára sústava dvoch fáz (stacionárna a mobilná), ktoré sú vzájomne nemiešateľné. Mechanizmus chromatografického delenia využíva zadržiavanie zmesi látok stacionárnou fázou a postupné a opakované vytváranie rovnováhy delených látok medzi stacionárnou a mobilnú fázou [36]. Tieto rovnovážne stavy sa vytvárajú na základe rôznych fyzikálno-chemických interakcií medzi analytom a prostredím [36]. Mnohokrát je stacionárna fáza sorbent v pevnej fáze a mobilná fáza je v kvapalinovej chromatografii kvapalina. Chromatografia môže mať cieľ analytický alebo preparatívny.

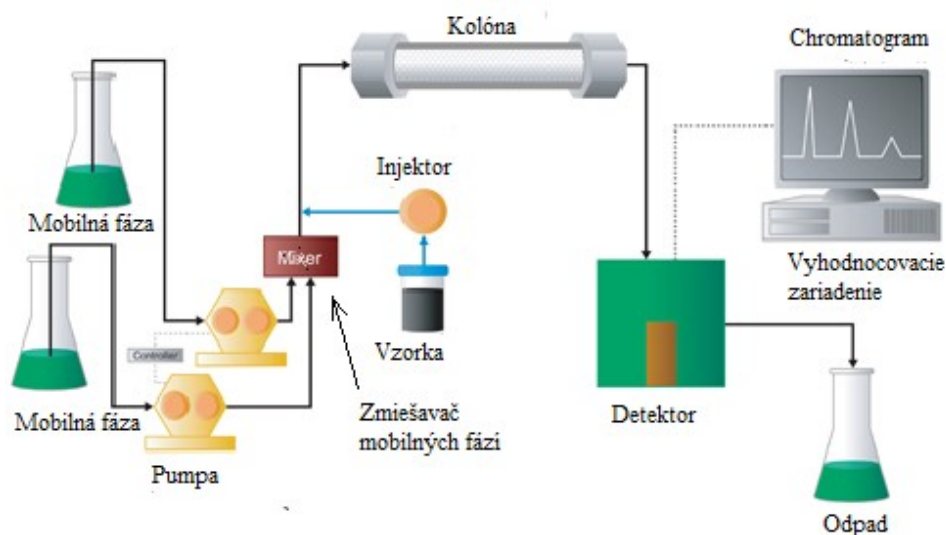
Základné usporiadanie kvapalinového chromatografu je schematicky znázornené na Obrázok 8. Ako môžeme aj z obrázku vidieť, mobilná fáza sa nachádza v zásobníku [37]. Mobilná fáza môže byť čerpaná izokraticky, kedy zloženie mobilnej fázy zostáva rovnaké, alebo gradientovou elúciou, čo znamená, že dochádza k zmene zloženia mobilnej fázy počas chromatografického delenia [38]; [37]. Ak by sa pracovalo v izokratickom móde, postačí jeden zásobník mobilnej fázy a tiež nie je potrebný zmiešavač mobilných fáz, ktorý u gradientovej je nevyhnutnou súčasťou kvapalinového chromatografu [37].

Dôležitou časťou chromatografu je čerpadlo, ktoré privádza mobilnú fázou do kolóny [37]. Čerpadla môžu byť piestové alebo membránové [38]. Materiál čerpadla (nerezová oceľ, plast, keramika, titan, zafír) nesmie do mobilnej fázy uvoľňovať žiadne látky a taktiež nesmie byť ňou narušovaný [38]; [39]. Dobré čerpadlo dosahuje prietok v rozsahu od mikrolitrov až do desiatok mililitrov za minútu [38].

Dávkovanie vzorky môže byť sprostredkované manuálne pomocou injekčnej ihly alebo automaticky pomocou automatického dávkovača (autosampler). V súčasnej dobe bývajú injekčné systémy nahradené obtokovým dávkovacím kohútom a tiež obľúbený systém je sedemcestný ventil, ktorý umožňuje meniť dávkovacie slučky rôzneho objemu [38].

Na kolóne prebieha samotná separácia zmesi analytov a nachádza sa v nej ukotvená stacionárna fáza. Kolóny môžeme rozdeliť na dva typy. preparatívne a analytické. V kvapalinovej chromatografii sa používajú náplňové kolóny, ktoré sú zhotovené z nerezovej ocele [37]. Analytické kolóny sú pomerne krátke s vnútorným priemerom 4,6 alebo 5 mm [38]. Kolóny s veľmi malým vnútorným priemerom majú vysokú účinnosť [38].

K detekcii látok separovaných na kolóne sa spravidla využíva obecných alebo špecifických vlastností, ktorými sa tieto látky líšia od mobilnej fázy. Na tomto základe sa také rozlišujú univerzálne a selektívne detektory. Najpoužívanjšie detektory sú fotometrický, refraktometrický a fluorescenčný [38]. Podmienkou pre využitie fotometrického detektora je, aby analyt absorboval žiarenie, u fluorescenčného je podmienkou emisia fluorescenčného žiarenia [36]. Ak analyt nevykazuje takúto vlastnosť je nutná derivatizácia vzorky [36]. Refraktometrický detektor je založený na meraní rozdielu indexu lomu svetla medzi mobilnou fázou a eluentom, nie je možné ho použiť pri gradientovej elúcii [36].



Obrázok 8 Schéma kvapalinového chromatografu [40]

3.5.1.1 Ionovymenná chromatografie

Táto separačná metóda je založená na silných elektrostatických interakciách medzi ionizovanými funkčnými skupinami stacionárnej fázy a opačne nabitými iónmi v okolitom roztoku [41]. Sila interakcie je určená počtom, veľkosťou náboja analytu a funkčnej skupiny [41]. Delené ióny sú z kolóny eluované v poradí, v akom stúpa afinita iónu k stacionárnej fáze, väčšinou sú ióny analytu eluované pomocou lineárneho gradientu soli v mobilnej fáze [41]. Ión výmenná chromatografia (chromatografia na ionexoch, IEC) je preto použiteľná pre elektrolyty schopné existencie v iónovej forme (katión, anión) [35]. Stacionárna fáza sú ionomeniče alebo tiež ionexy, ktoré majú štruktúru priestorovej siete, sú mikroporézne a funkčné skupiny sú na povrchu i vo vnútri častíc meniča.

Pre separáciu cukrov pomocou IEC je výhodne použiť stacionárnu fázu s funkčnými skupinami o kladnom náboji (anex) ako sú napríklad kvartérne amíny [42]. Pre detekciu sa používajú rôzne detektory ako napríklad pulzná ampérometrická detekcia, UV detektor alebo diferenciálny refraktometer [43]; [44].

3.5.1.2 Chromatografia na reverzných fázach s hmotnostným detektorom

Chromatografia na reverzných fázach s hmotnostným detektorom (RP-LC-MS) je analytická metóda, kde je v spojení kvapalinová chromatografia s hmotnostným analyzátorom [38]. RP-LC je skratka pre chromatografiu na obrátených fázach, kde stacionárna fáza je nepolárna (uhl'ovodíky alebo alkyly viazané na silikagél) a mobilná fáza je polárna (voda, acetonitril) [38]. Rast retenčných časov zložiek rastie s ich klesajúcou polaritou a zväčšujúcou sa nepolárnou časťou molekuly [38]. Pre účely identifikácie látok sa chromatografia na reverzných fázach používa v spojení s hmotnostným detektorom (MS), čím sa okrem retenčného času látky v HPLC získa aj informácia o jej hmotnostnom spektre. V literatúre sa môžeme stretnúť s metódami separácie oligomérov hyaluronanu na reverzných fázach, v ktorých sa do mobilných fáz pridáva iono-párové činidlo tributylamín [45]. Takéto činidlá sú však v systéme LC-MS nežiaduce, pretože sa ťažko vymývajú a zvyšujú pozadie pri MS analýze. Pre analýzu oligosacharidov HA pomocou tejto metódy je vhodné použiť ako iónový zdroj elektrosprej (ESI) v negatívnom móde. Vhodnými mobilnými fázami sú napríklad kyselina mravčia vo vode a metanol alebo THF a metanol [46]. Najdôležitejším parametrom MS analýzy oligosacharidov HA je ionizačné napätie, ktoré zohráva dôležitú úlohu pri interpretácii získaných výsledkov. Toto napätie nesmie byť príliš nízke, pretože by to viedlo k nedostatočnému množstvu iónov privedených do analyzátoru, ale naopak nesmie sa zvýšiť natoľko, aby nedošlo k fragmentácii oligomérov. Za podmienok ionizácie elektrosprejom sú nižšie oligoméry predovšetkým v nižších nábojových stavoch, kým tie vyššie majú maximum distribúcie náboja v oblasti vyšších nábojových stavov. Viacnásobne nabité ióny je zložitejšie interpretovať ako u ionizácie pomocou MALDI [46].

3.5.2 Kapilárna elektroforéza

Kapilárna elektroforéza patrí do skupiny elektromigračných separačných metód, konkrétne kde sa využíva elektrokinetický jav – elektroforéza [38]. Kapilárne elektromigračné metódy sa v poslednej dobe súborne označujú ako vysokoúčinná kapilárna elektroforéza (HPCE) [47]. Kľúčovou veličinou týchto elektromigračných separačných metód je elektroforetická pohyblivosť (mobilita), definovaná ako rýchlosť pohybu nabitých častíc v kvapalnom prostredí v jednosmernom elektrickom poli o jednotkovej intenzite [47]. Pohyblivosť iónu je priamo úmerná jeho náboju a nepriamo úmerná polomeru a tiež viskozite roztoku [47]. V prípade slabých elektrolytov je pohyblivosť závislá na stupni disociácie a teda aj na pH prostredia [47]. Okrem elektroforetického pohybu je častým transportným javom elektroosmotický tok [47]. Vzniká pôsobením jednosmerného elektrického poľa na difúziu časť elektrickej dvojvrstvy [47]. Vznik elektrickej dvojvrstvy je dôsledkom selektívnej adsorpcie jedného druhu iónov na stenu kapiláry alebo disociácie iónových skupín na vnútornej časti kapiláry (napr. silanolové skupiny) [47].

Máme niekoľko typov kapilárnej elektroforézy: izoelektrická fokusácia, zónová elektroforéza, izotachoforéza, elektroforéza v sieťovacích prostrediach a i. Obecne v prípade kapilárnej elektroforézy základné usporiadanie spočíva v tom, že kapilára naplnená základným

elektrolytom, ktorý vedie prúd a konce kapiláry sú ponorené do zásobníkov s elektrolytom spoločne s elektródami z inertného materiálu (Pt) [38]. Medzi elektródy sa aplikuje vysoké napätie [38]. Malý objem vzorky sa aplikuje na jeden koniec kapiláry a sleduje sa odozva detektoru, väčšinou fotometrického [38].

Jej separácia s vysokým rozlíšením, rýchla analýza, kvantifikácia analytov a nenáročnosť na objem vzorky robia túto metódu veľmi hodnotnú [34]. Je zavedených už mnoho postupov pre analýzu hyaluronanu a jeho fragmentov ako pre normálnu polaritu (aplikácia vzorky na anódu a detekcia na katóde) tak aj pre obrátenú polaritu (detekcia prebieha na anóde) [34]. Detektory používané pri analýze OHA pomocou kapilárnej elektroforézy sú UV detektor, hmotnostný spektrometer (ionizácia pomocou ESI), detektor diódového poľa (DAD) [48]; [49]; [50].

3.5.3 Nukleárna magnetická rezonancia

Skratka NMR je z anglického slova *Nuclear magnetic resonance* a v preklade znamená nukleárna magnetická rezonancia. Pre jav NMR sú dôležité dve vlastnosti atómových jadier a to sú vlastný rotačný moment a magnetický moment [51]. Vlastný rotačný moment jadra, označovaný ako spin, je zjednodušene povedané rotácia samotného jadra okolo vlastnej osi [51]. Pre existenciu NMR je nenulový spin základná podmienka [51]. Druhou kľúčovou vlastnosťou je magnetický moment jadier μ a ten hovorí o tom, že atómové jadra sa správajú ako magnetky [51]. Všetky interakcie súvisiace s NMR sú magnetické. Ak jadro s nenulovým spinom umiestnime do vonkajšieho magnetického poľa, pole núti magnetický moment jadra sa zorientovať do jeho smeru, avšak spin jadra bráni tejto zmene orientácie a výsledkom je procesovanie magnetického momentu okolo vonkajšieho poľa, kedy sa jeho orientácia k tomuto poľu nemení [51]. V NMR sa využívajú magnetické polia s veľkosťou 0,1–20 Tesla a pri takýchto poliach je frekvencia precesie spinov v oblasti 1–1000 MHz, čo spadá do radiofrekvenčnej oblasti [51].

Oligosacharidy hyaluronanu môžu byť premerané pomocou NMR spektra, kedy sa merajú ^1H a ^{13}C NMR spektra v D_2O roztoku [52].

3.6 Využitie oligosacharidov hyaluronanu

Využitie kyseliny hyalurónovej v kozmetickom a farmaceutickom priemysle má dlhú tradíciu. Vďaka svojim viskoelastickým vlastnostiam je vysokomolekulárna kyselina hyalurónová ideálnym komponentom napríklad pre výrobu výplní vrások alebo chirurgických implantátov. Nespornou výhodou používania HA je jej biokompatibilita a to, že sa prirodzene vyskytuje v mnohých tkanivách, preto pri jej používaní je znížené riziko alergických reakcií. Úzko špecializované oblasti, v ktorých sa dnes kyselina hyalurónová využíva, sú ortopédia a reumatológia, kde sa uplatňuje ako lubrigačná zmes, a oftamológia, kde sa HA používa napr. pri operáciách oka alebo je súčasťou očných kvapiek [30]. Výsadné postavenie si HA zachováva v kozmetických aplikáciách, predovšetkým v oblasti anti-agingu. Pri hojení rán

slúži ako kryt poranenia, kde vytvára prostredie umožňujúce vlhké hojenie a tiež sa rozpadá na oligosacharidy s regulačnou aktivitou [53]. Kryty na poranenia vo forme HA hydrogélom už boli použité klinicky niekoľkými lekármi [53].

Použití vysokomolekulárneho hyaluronanu má však tiež svoje nevýhody. Vysoko viskózne roztoky HA sú nestabilne pri zvýšení teploty alebo zmene pH a ťažko sa spracovávajú do zmesi ďalších látok. V týchto prípadoch je výhodnejšie použiť štepený hyaluronan o nižšej molekulovej hmotnosti. Navyše fragmenty hyaluronanu, obzvlášť niektoré typy oligosacharidov HA (OHA), sú nositeľmi rôznych biologických vlastností a môžu fungovať ako signálne molekuly [54]. Nízkomolekulárna HA alebo oligosacharidy HA zvyšujú proliferáciu fibroblastov, migráciu buniek, stimulujú formovanie nových krvných ciev a aktivujú makrofágy [2]. Taktiež stimulujú tvorbu kolagénu endotelových buniek [53]. Veľmi malé fragmenty HA sú schopné inhibovať rast niektorých typov rakovinových buniek, čo z nich potenciálne vytvára komponentu mnohých liečivých prípravkov [55]. Fragmenty HA v spojení s cytostatikami pomáhajú zacieliť liečbu na konkrétny karcinóm. Napríklad konjugát PTX-HA (Paclitaxel s HA) ukázal selektívnu toxicitu voči ľudským karcinómom ako je prsníka, hrubého čreva, vaječníkov, ktoré sú známe nadmernou exprimáciou receptora hyaluronanu CD44 [56].

Vlastnosť OHA ako je napríklad podpora angiogenézy, kde sa táto podporná vlastnosť ukazuje u oligosacharidov o dĺžke 3–10 disacharidov, by mohlo nájsť potencionálne využitie v liečení poranení [53]. Taktiež bolo preukázané, že nízkomolekulárny hyaluronan má priamu a silnú antioxidantnú aktivitu, dokonca vyššiu ako vysokomolekulárna kyselina hyalurónová [57]. Fragmenty hyaluronanu si našli svoje uplatnenie aj v kozmetike v boji proti vráskam. Firma Contipro vyrába kozmetickú surovinu Oligohyaferre, u ktorej sa ukázalo, že je efektívna proti vonkajším príznakom starnutia a taktiež suroviny Hysilk a Hyactive, ktoré potláčajú vrásky a vylepšujú textúru pleti.

Ako už bolo spomenuté, oligosacharidy HA majú výrazne odlišné vlastnosti ako natívny HA. Jedným z ambiciózných spôsobov využitia fragmentov HA je ich aplikácia v cielej distribúcii liečiv, ktorá je neustále predmetom výskumu. V prípade subkutánnej distribúcie liečiv existujú dobré dôvody prečo je výhodnejšie použitie fragmentov HA namiesto natívneho HA [46]. Malé molekuly lepšie prenikajú do kože [46]. Navyše prípadná prítomnosť dvojitéch väzieb v štruktúre oligosacharidov HA je dôležitá pre zachytávanie radikálov a v neposlednom rade fragmenty HA sú prístupnejšie pre charakterizáciu hmotnostnou spektrometriou, čo je povinné pre kontrolu kvality [46].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Chemikálie

Názov chemikálie	Skratka	Výrobca	Poznámky
β - Glukuronidáza	-	Sigma-Aldrich	typ B-1 $\geq 1\,000\,000$ U/g
Hovädzia testikulárna hyaluronidáza	BTH	Finepharm	1 428 U/mg
Chlorid sodný	NaCl	Sigma-Aldrich	čistota $\geq 99,5$ %
Kyselina octová, reag. Ph Eur	CH ₃ COOH	Merck	čistota 100 %
Octan sodný bezvodý	CH ₃ COONa	Lach:ner	čistota 98,5 %
Voda R	H ₂ O	Contipro Biotech	laboratórium E239
Hyaluronát sodný (dekamer)	HA ₁₀ ^{AN}	Contipro Biotech	šarža SH-100913
Hyaluronát sodný (vysokomolekulárny)	HMW HA	Contipro Biotech	šarža HA 030810-3-D2 kozmetická kvalita, 0,866 MDa

4.2 Prístroje

Kvapalinový chromatograf Acquity UHPLC s PDA detektorom, Waters

Autopurifikačný systém Waters s detektorom 2489 UV-VIS a SQD2 hmotnostným spektrometrom

Analytické váhy Mettler Toledo, odpočítateľnosť 0.1 mg

Sklenená filtračná aparátúra, Chromservis

4.3 Metódy a postupy

4.3.1 Príprava oligosacharidov hyluronanu s N-acetylglukozamínom na oboch koncoch reťazca s využitím enzýmovej katalýzy

4.3.1.1 Optimalizácia teploty enzymatickej degradácie

Prvé meranie

Pre prvé meranie bolo pripravených 6 vzoriek oligosacharidov $\text{HA}_{10}^{\text{AN}}$ o výslednej koncentrácii 3 mg/ml. Oligosacharidy boli rozpustené v octanovom tlmivom roztoku o koncentrácii 0,03 M a pH 5. Pre objem 14,1 ml octanového tlmivého roztoku bolo navážených $45 \pm 0,1$ mg $\text{HA}_{10}^{\text{AN}}$. V súhlasnom tlmivom roztoku bol rozpustený enzým β -Glukuronidáza, aby konečná koncentrácia bola 2 mg/ml.

Optimalizácia teploty prebiehala pri odlišných podmienkach u každej vzorky. Bolo zvolených šesť rôznych teplôt: 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C. Vzorky boli pred zahájením reakcie temperované 10 minút na danú teplotu. Reakcia bola zahájená pridaním 0,9 ml enzýmu do každej vzorky. Reakcia prebiehala 4 hodiny a každých 30 minút boli odoberané vzorky o objeme 1,5 ml. Reakcia bola ukončená prevarením vo vodnom kúpeli (100 °C) po dobu 3 minút a schladením pomocou ľadu. Následne boli vzorky prefiltrované do vialiek cez nylonový filter o veľkosti pórov 0,22 μm a analyzované UHPLC metódou popísanou v kapitole 4.3.3.

Druhé meranie

Druhé meranie prebiehalo za rovnakých podmienok ako sú popísané v prvom meraní. Odlišný bol počet zvolených teplôt a celkový objem vzorky. Bolo vybratých desať rôznych teplôt: 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C. Celkový objem každej vzorky bol 10 ml a teda množstvo naváženého oligosacharidu $\text{HA}_{10}^{\text{AN}}$ činilo $30 \pm 0,1$ mg.

Zloženie každej vzorky po reakcii bolo analyzované metódou UHPLC, popísanou v kapitole 4.3.3, na prístroji Acquity (Waters) s UV detekciou pri 210 nm.

4.3.1.2 Optimalizácia pH enzymatickej degradácie

Bolo pripravených 5 vzoriek oligosacharidu $\text{HA}_{10}^{\text{AN}}$ o výslednej koncentrácii 3 mg/ml. Oligosacharidy boli rozpustené v octanovom tlmivom roztoku o koncentrácii 0,03 M. Pre objem 9,4 ml octanového tlmivého roztoku bolo navážených $30 \pm 0,1$ mg $\text{HA}_{10}^{\text{AN}}$. V rovnakom tlmivom roztoku bol rozpustený enzým β -Glukuronidáza, aby výsledná koncentrácia bola 2 mg/ml.

Optimalizácia prebiehala pri teplote 37 °C. Bolo zvolených 5 rôznych pH tlmivého roztoku: pH 4, pH 4,5, pH 5, pH 5,5, pH 6. Vzorky boli vytemperované na danú teplotu v inkubátore, kde boli uložené po celú dobu reakcie. Reakcia bola zahájená pridaním 0,6 ml enzýmu do

každej vzorky. Celková dĺžka reakcie bola 4 hodiny a každých 30 minút boli odobraté vzorky o objeme 1,2 ml na UHPLC analýzu. Reakcia bola ukončená varom po dobu 3 minút a následným schladením pomocou ľadu. Následne sa vzorky prefiltrovali do cez striekačkový nylónový filter, ktorého veľkosť pórov bola 0,22 µm.

Vzorky po reakcii bolo analyzované metódou UHPLC popísanou v kapitole 4.3.3, ktorá prebehla na prístroji Acquity od firmy Waters s UV detekciou pri 210 nm.

4.3.2 Príprava zmesi oligosacharidov hyaluronanu s N-acetylglukozamínom na oboch koncoch reťazca s využitím enzýmovej katalýzy

Počiatočným materiálom pre získanie oligomerov HA typu NN bol vysokomolekulárny hyaluronan, ktorý bol podrobený štiepeniu špecifickým enzýmom BTH (hovädzia testikulárna hyaluronidáza) a výsledným produktom bola zmes párných oligosacharidov typu AN. Navážka 20,0 g vysokomolekulárneho hyaluronanu bola rozpustená v 2 000 ml tlmivého roztoku o složení 10 mM CH₃COONa + 20 mM NaCl; pH 5,4. Následne po rozpustení bol roztok vytemperovaný vo vodnom kúpeli na teplotu 37 °C a potom bola k roztoku pridávaná hyaluronidáza BTH o množstve 20 U na mg HA. Štiepenie prebiehalo za neustáleho mierneho miešania po dobu 15 hodín. Po 15 hodinách bolo enzymatické štiepenie zastavené prefiltrovaním pomocou hĺbkovej filtrácie a následnej filtrácií cez nylónový filter. Takto pripravená zmes oligosacharidov sa rozdelila na menšie objemy (200-250 ml) a zatavila do vreciek a bola uskladnená v mraziacom boxe.

Zloženie pripravenej zmesi oligosacharidov HA bolo overené vysokotlakou kvapalinovou chromatografiou na prístroji Acquity od firmy Waters s UV detekciou pri vlnovej dĺžke 210 nm popísanou v kapitole 4.3.3.

Časť pripravenej zmesi párných oligosacharidov HA bola rozmrazená a ponechala sa vytemperovať vo vodnom kúpeli na požadovanú teplotu (37 °C). Koncentrácia zmesi OHA bola 10 mg/ml, objem 15 ml. Následne sa k zmesi pridal špecifický enzým β-Glukuronidáza, rozpustený v octanovom tlmivom roztoku o objeme 1 ml a koncentrácií 6 mg/ml. Priebeh štiepenia bol pozorovaný pomocou UHPLC. Po overení, že bolo dosiahnuté dostatočné množstvo oligosacharidov typu NN (24 hod), degradácia bola ukončená. Enzymatické štiepenie bolo ukončené varom po dobu 3 minút.

Analýza pripravených nepárných oligosacharidov typu NN prebehla metódou UHPLC popísanou v kapitole 4.3.3 a metódou LC-MS popísanou v kapitole 4.3.4.

4.3.3 Analýza produktov po enzymatickej hydrolýze

Zloženie produktu po enzymatickej hydrolýze bolo analyzované metódou UHPLC na prístroji Acquity (Waters) s UV detekciou pri 210 nm. Analýza prebiehala pri 25 °C s použitím kolóny QA-825 (8,0 x 75 mm) od firmy Shodex. Jednotlivé analyty boli eluované pri prietoku 1 ml/min s gradientom dvoch mobilných fáz: A) 20 mM NaCl, B) 250 mM NaCl, kde

priebeh gradientovej elúcie bol podľa programu, viď Tabuľka 1. Celková doba analýzy bola 50 minút a objem nástreku vzorky bol 30 µl. Dáta boli vyhodnotené systémom Empower (Waters).

Z nameraného chromatogramu sa prostredníctvom chromatografického softwaru Empower3 hodnotili plochy dvoch píkou: HA₁₀^{AN} a HA₉^{NN}.

Tabuľka 1 Gradient elúcie pri UHPLC analýze na kolóne QA-825 (8,0 x 75 mm), Shodex

Čas [min]	Mobilná fáza A [%]	Mobilná fáza B [%]
0,00	100	0
5,00	100	0
35,00	33	67
36,00	0	100
41,00	0	100
42,00	100	0
50,00	100	0

4.3.4 Identifikácia vybraných vzoriek pomocou LC-MS

Identifikácia vybraných vzoriek oligosacharidov HA pomocou LC-MC bola vykonaná na autopurifikačnom systéme Waters s detekciou pomocou UV-VIS (210 nm) a hmotnostným spektrometrom SQD2. Separácia analytov prebiehala na C18 kolóne Jupiter 4 µm Proteo 90Å (250 x 4,6 mm), Phenomenex pri laboratórnej teplote. Jednotlivé analyty boli eulované pri prietoku 1 ml/min gradientom dvoch mobilných fáz: A) 0,1 % HCOOH B) 100 % MeOH. Priebeh gradientovej elúcie prebiehal podľa programu uvedeného v Tabuľka 2. Objem nástreku vzorky bol 20 µl a celková doba analýzy bola 55 minút.

Ako iónový zdroj hmotnostnej spektrometrie bol použitý elektrosprej, ktorý pracoval v negatívnom móde. Eluát z kolóny bol privádzaný do iónového zdroja bezprostredne po HPLC separácii. Rýchlosť zbierania dát bola 1 scan/s. Ako vysúšací plyn (40 L/hr) a desolvatačný plyn (500 L/hr) bol použitý dusík, ktorého teplota bola 500 °C. Napätie na kapiláre bolo 3,0 kV a sampling cone bola nastavená na 60 V. Ako hmotnostný analyzátor bol použitý jednoduchý kvadrupól. Pre vyhodnotenie dát bol použitý MassLynx software.

Tabuľka 2 Gradient elúcie pri LC-MS analýze na C18 kolóne Jupiter 4 μ m Proteo 90Å (Phenomenex)

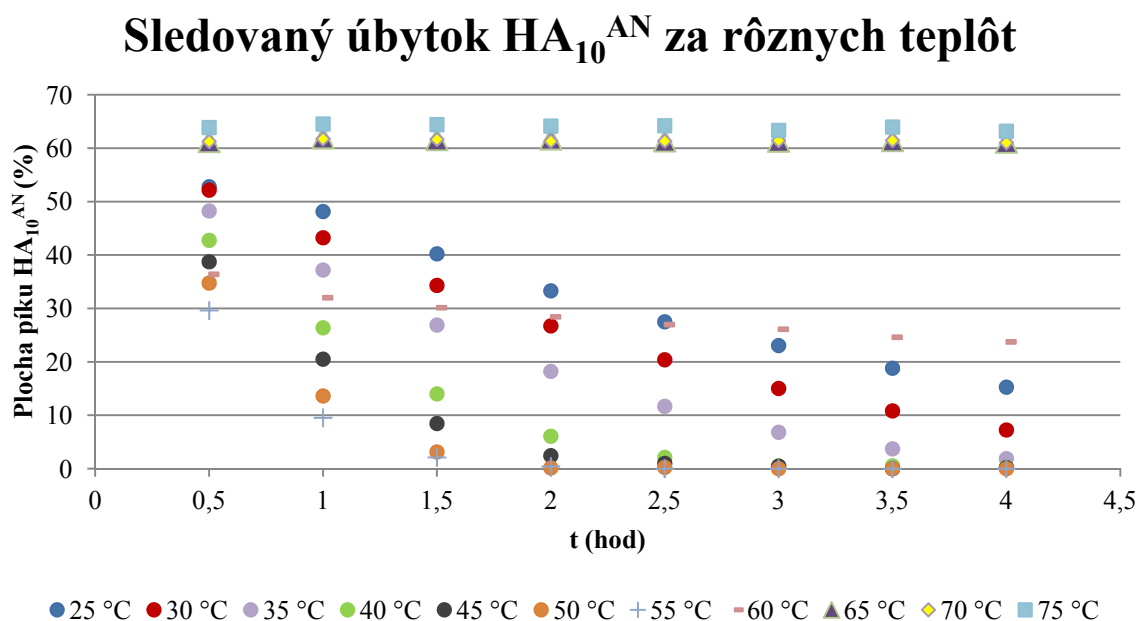
Čas [min]	Mobilná fáza A [%]	Mobilná fáza B [%]
0,00	100	0
2,50	100	0
40,00	70	30
42,00	5	95
47,00	5	95
48,00	100	0
55,00	100	0

5 VÝSLEDKY

5.1 Optimalizácia podmienok degradácie β -Glukuronidázou

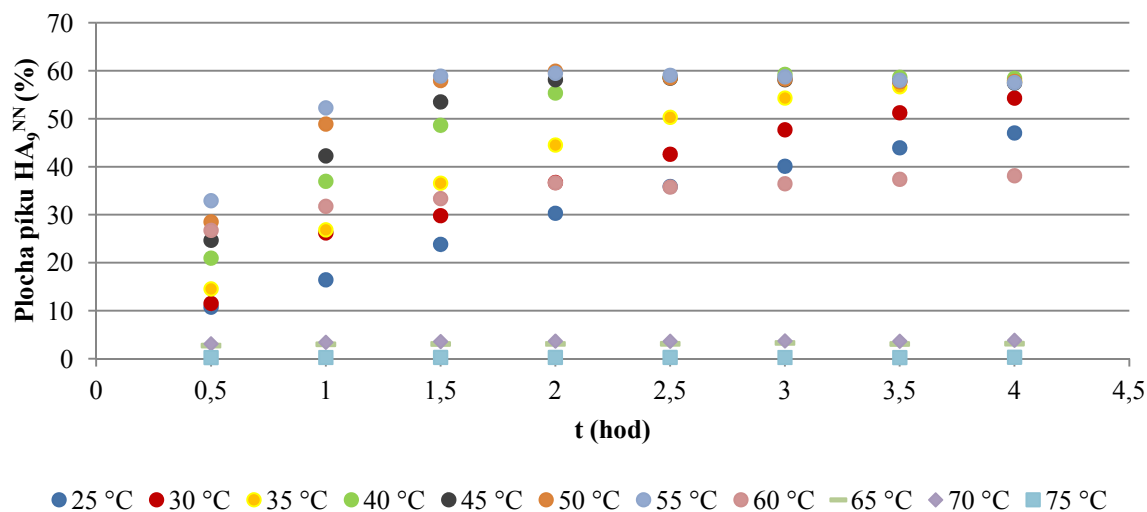
5.1.1 Optimalizácia teploty

Teplota bola optimalizovaná tak, ako je popísané v kapitole 4.3.1.1.



Obrázok 9 Graf závislosti úbytku HA_{10}^{AN} na čase pri enzymatickom štiepení za rôznych teplôt. Osa y vyjadruje relatívne plochy pík voči nástreku nedegradovaného štandardu (v čase 0 je teoreticky plocha 100%)

Sledovaný prírastok HA_9^{NN} za rôznych teplôt



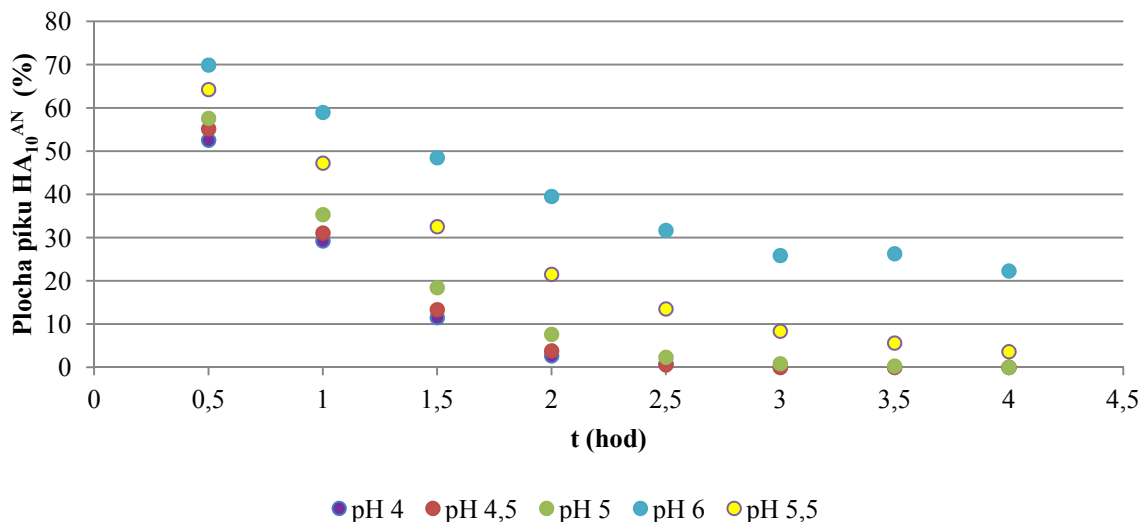
Obrázok 10 Graf závislosti prírastku HA_9^{NN} na čase pri enzymatickom štiepení pri rôznych teplotách, kde osa y vyjadruje relatívne plochy píkovoči nástreku nedegradovaného štandardu (v čase 0 je teoreticky plocha 100%)

Z grafov pre koncentrácie HA_{10}^{AN} a HA_9^{NN} v závislosti na čase je možné tvrdiť, že s rastúcou teplotou sa zvyšuje aj rýchlosť reakcie až po teplotu 55 °C (Obrázok 9, Obrázok 10), kedy rýchlosť reakcie dosahuje maximum. Pri teplotách vyšších ako 55 °C rýchlosť reakcie klesá a pri teplote 65 °C a vyššej už reakcia neprebíha. Zastavenie reakcie pri vyšších teplotách je pravdepodobne spôsobené denaturáciou enzýmu β -Glukuronidázy, čo znamená že dôjde k štruktúrnej zmene enzýmu.

5.1.2 Optimalizácia pH

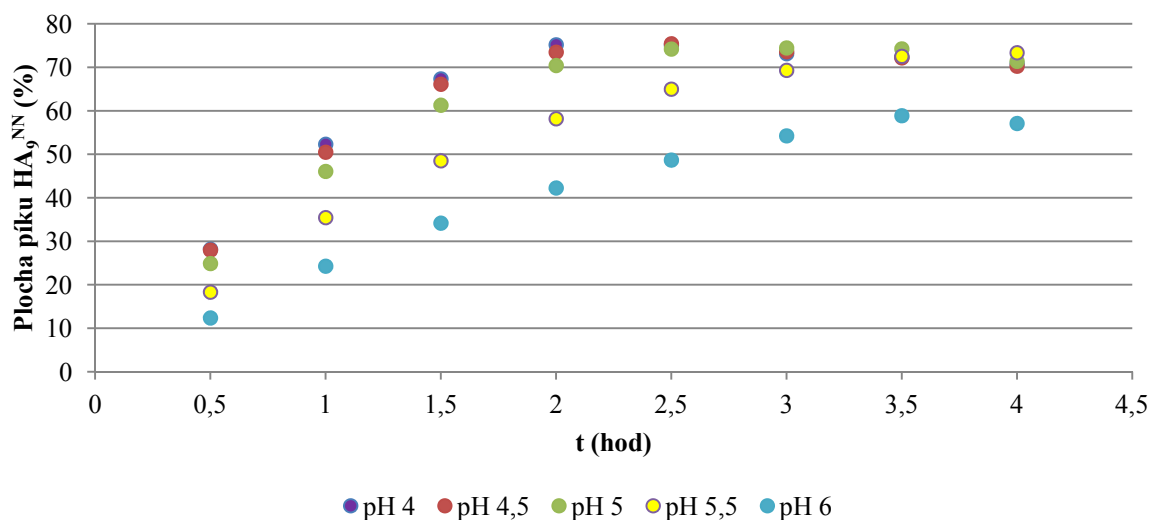
Optimalizácia pH prebiehala za podmienok popísaných v kapitole 4.3.1.2.

Sledovaný úbytok HA_{10}^{AN} pri rôznych pH



Obrázok 11 Graf závislosti poklesu koncentrácie HA_{10}^{AN} na čase pri enzymatickom štiepení pri odlišných pH. Osa y vyjadruje relatívne plochy píkovo voči nástreku nedegradovaného štandardu (v čase 0 je teoreticky plocha 100%)

Sledovaný prírastek HA_9^{NN} při různém pH

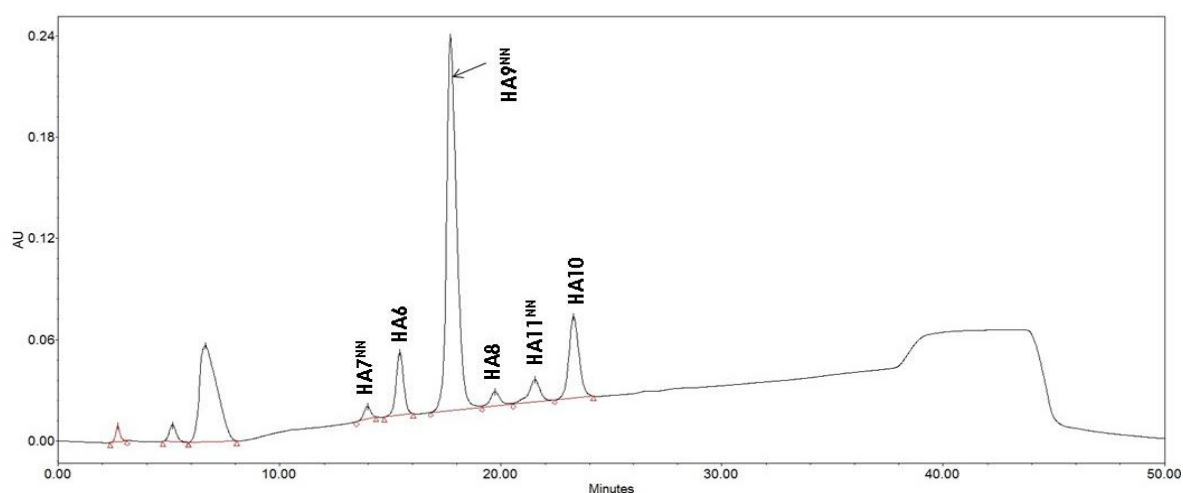


Obrázok 12 Graf závislosti percentuálnej koncentrácie HA_9^{NN} na čase pri enzymatickom štiepení za rôzneho pH. Osa y vyjadruje relatívne plochy píkovo voči nástreku nedegradovaného štandardu.

Z grafu pre úbytok HA_{10}^{AN} a taktiež grafu pre prírastok HA_9^{NN} môžeme pozorovať, že reakcia prebiehala najpomalšie pri pH 6 (Obrázok 11, Obrázok 12). Najrýchlejšie enzymatické štiepenie prebiehalo pri pH 4 a v rozmedzí pH medzi 4,5 až 5,5 mala rýchlosť reakcie klesajúcu tendenciu. Z optimalizácie pH môžeme povedať že optimálne pH pre enzymatickú prípravu oligosacharidov s N-acetylglukozamínom na oboch koncoch je 4.

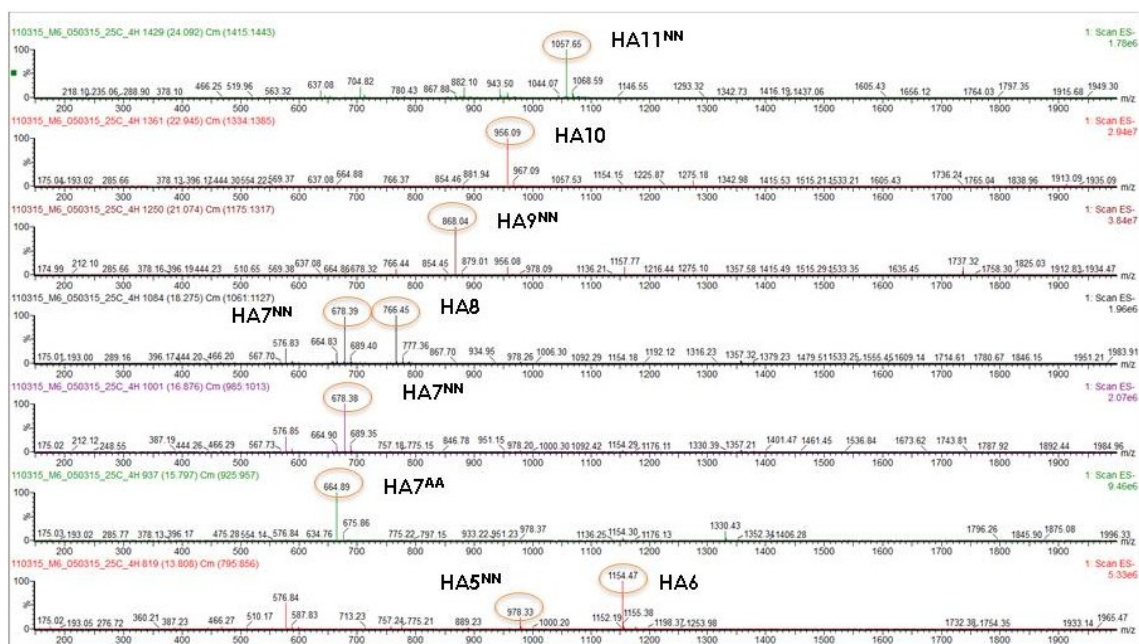
5.1.3 Charakterizace pripravených oligosacharidov HA_9^{NN} pomocou UHPLC a LC-MS

Analýza jednotlivých vybraných vzoriek oligosacharidov HA_9^{NN} pripravených degradáciou pomocou β -Glukuronidázy prebiehala za podmienok popísaných v kapitole 4.3.4. Pre analýzu boli vybrané 3 vzorky, a to konkrétne tie, u ktorých prebiehala degradácia pri teplotách: 25 °C, 50 °C a 60 °C. Všetky vzorky sú odobrané po štyroch hodinách degradácie.



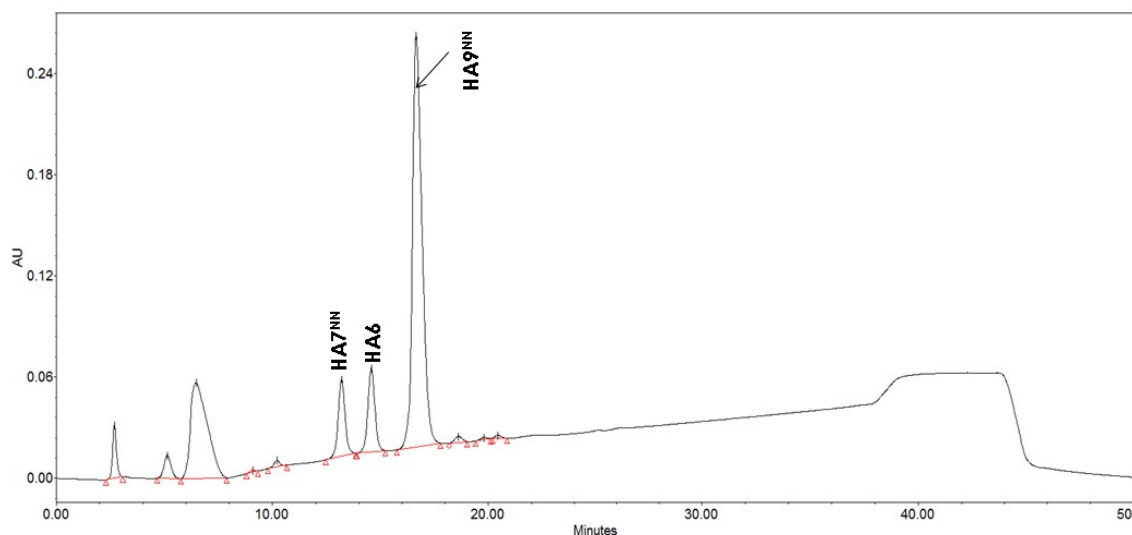
Obrázok 13 Chromatogram po degradácii oligosacharidov HA_{10}^{AN} enzýmom β -Glukuronidáza. Degradácia prebiehala pri 25°C 4 hodiny.

Z chromatogramu po UHPLC analýze je možné pozorovať, že majoritné zastúpenie vo vzorke má HA_9^{NN} (50,63 %), ktorý je v dôsledku nízkej teploty degradácie značne znečistený HA_{10} (11,11 %). Nepremenené množstvo substrátu indikuje zníženú aktivitu enzýmu (Obrázok 13).



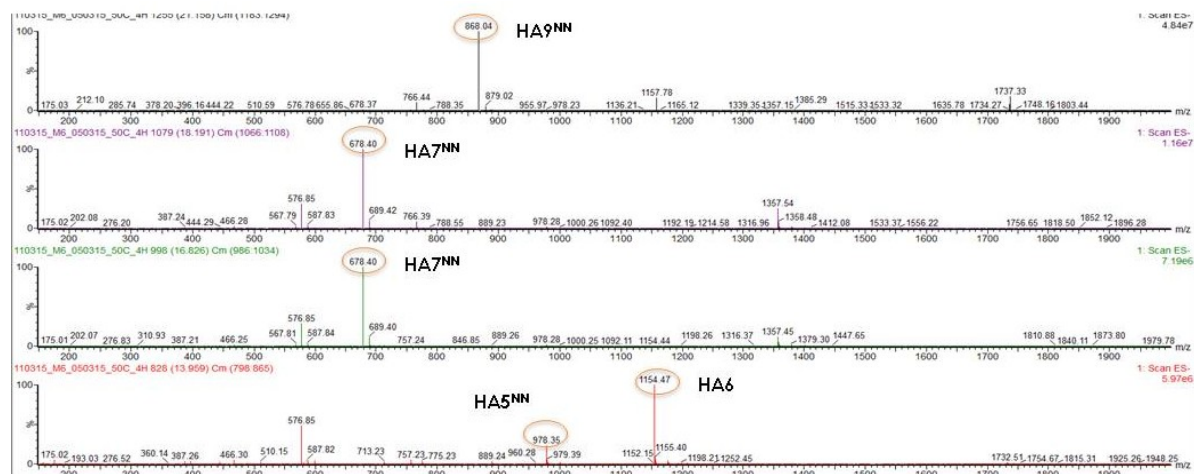
Obrázok 14 MS spektra po degradácii oligosacharidov HA_{10}^{AN} enzýmom β -Glu. Degradácia prebiehala pri 25°C po dobu 4hodiny.

Pomocou LC-MS analýzy bola overená štruktúra vznikajúceho produktu a na základe MS spektier podľa pomeru molekulovej hmotnosti a náboja. Ďalej boli identifikované aj ostatné produkty nachádzajúce sa vo vzorke – HA_9^{NN} , HA_8 , HA_7^{NN} , HA_7^{AA} a HA_6 . Tieto látky sú pravdepodobne produkty ďalších vedľajších reakcií (Obrázok 14).



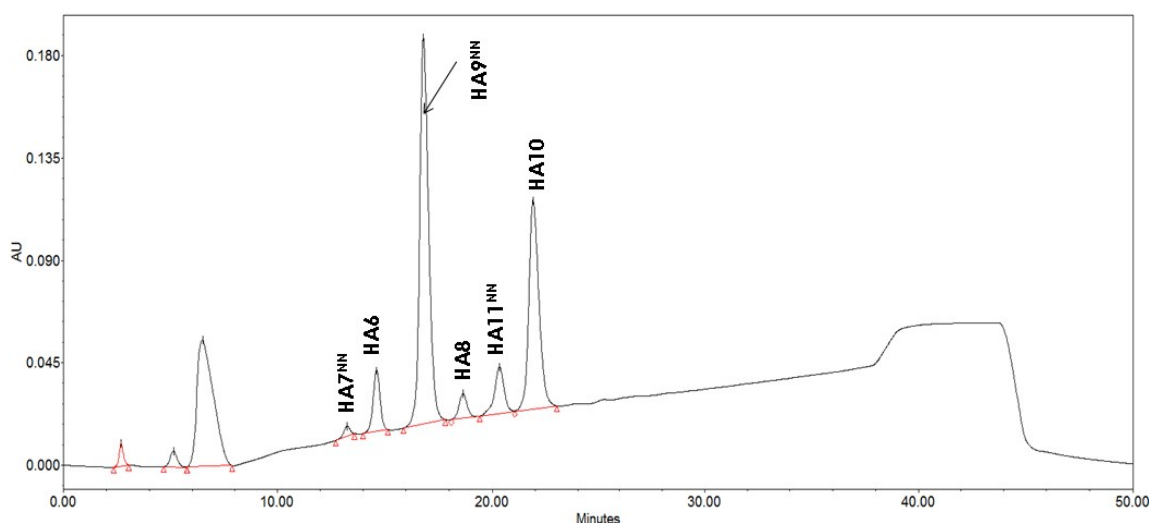
Obrázok 15 Chromatogram po degradácii oligosacharidov HA_{10}^{AN} enzýmom β -Glu. Degradácia prebieha pri 50° po dobu 4hodiny.

Chromatogram z UHPLC analýzy po 4 hodinách degradácie pri teplote 50 °C poukazuje na vhodnosť zvolenej teploty, pretože vo vzorke sa nenachádzalo detekovateľné množstvo HA_{10}^{AN} (Obrázok 15) a teda je možné predpokladať, že všetok substrát bol premenený na produkt. Na chromatograme je možné pozorovať väčšinové zastúpenie oligosacharidu HA_9^{NN} (56,99 %) a tiež dva vedľajšie produkty o nízkej koncentrácii.



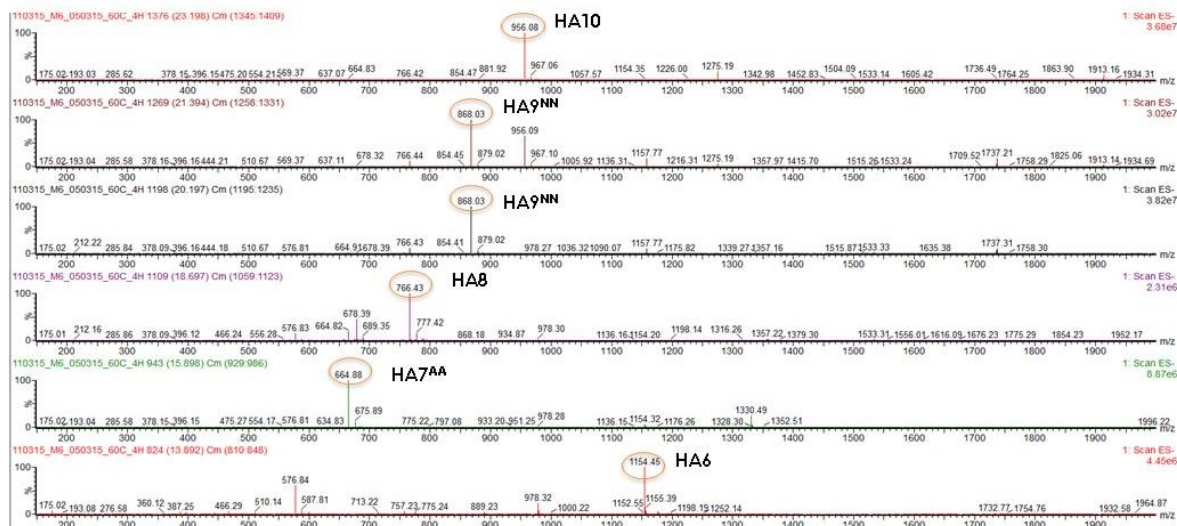
Obrázok 16 MS spektra po degradácii oligosacharidov HA_{10}^{AN} enzýmom β -Glu. Degradácia prebieha pri 50 °C, 4hodiny.

Na základe LC-MS analýzy bola overená štruktúra požadovaného produktu (HA_9^{NN}) a takisto podľa pomeru molekulovej hmotnosti a náboja boli identifikované aj zvyšné dva produkty obsiahnuté vo vzorke – HA_6 a HA_7^{NN} (Obrázok 16). Tieto produkty s najväčšou pravdepodobnosťou vznikajú pri ďalších vedľajších reakciách.



Obrázok 17 Chromatogram po degradácii oligosacharidov HA_{10}^{AN} enzýmom β -Glukuronidáza. Degradácia prebieha pri 60° po dobu 4hodiny.

Z chromatogramu po UHPLC analýze je možné sledovať, že majoritnou zložkou vo vzorke je HA_9^{NN} a druhé najväčšie zastúpenie vo vzorke po 4 hodinách enzymatickej degradácie pri 60 °C má oligosacharid $\text{HA}_{10}^{\text{AN}}$ (Obrázok 17). Takéto zastúpenie vo vzorke poukazuje na zníženú aktivitu enzýmu spôsobenú vysokou teplotou.

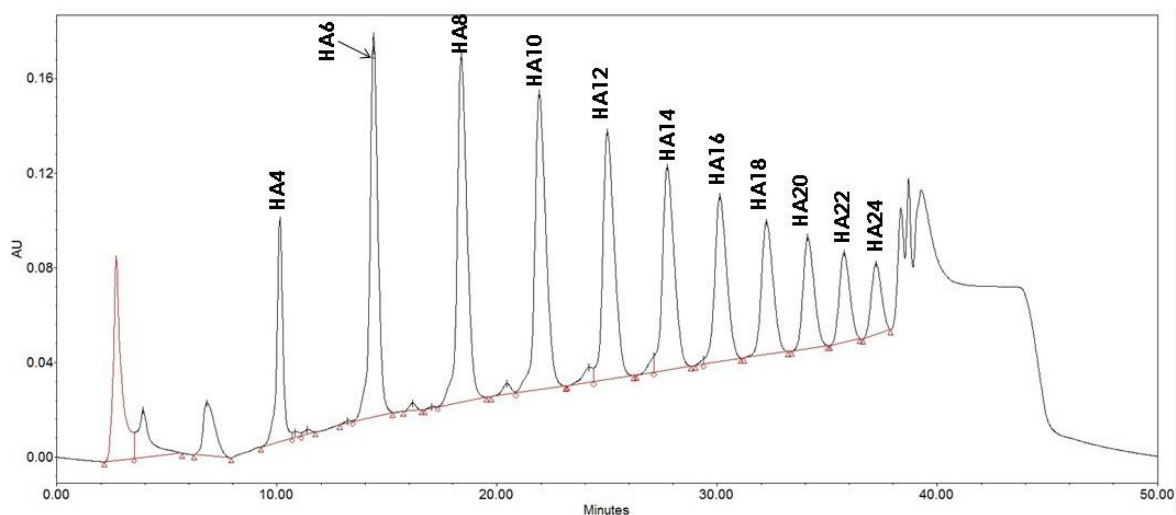


Obrázok 18 MS spektra po degradácii oligosacharidov $\text{HA}_{10}^{\text{AN}}$ enzýmom β -Glukuronidázou. Degradácia prebieha pri 60 °C po dobu 4hodiny.

Pomocou metódy LC-MS bola overená zhoda štruktúry vznikajúceho a požadovaného produktu (HA_9^{NN}) a takisto podľa pomeru molekulovej hmotnosti a náboja boli identifikované aj zvyšné produkty obsiahnuté vo vzorke. Zvyšné produkty boli identifikované ako HA_8 , HA_7^{AA} , HA_6 , ktoré pravdepodobne sú produktom vedľajších reakcií (Obrázok 18).

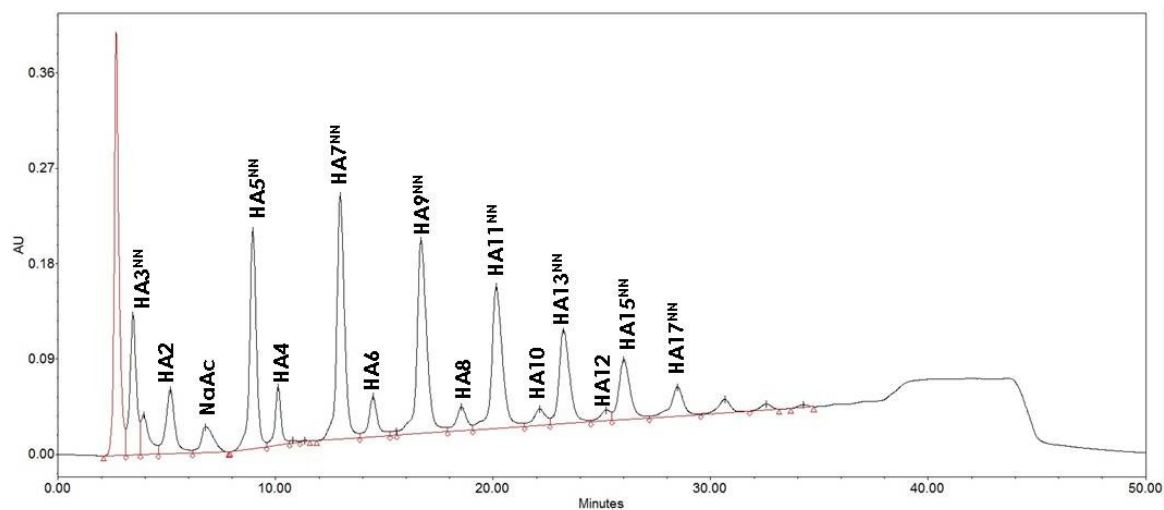
5.1.4 Príprava zmesi oligosacharidov hyaluronanu s N-acetylglukozamínom na oboch koncoch reťazca s využitím enzymovej katalýzy

Príprava zmesi oligosacharidov hyaluronanu s N-acetylglukozamínom na oboch koncoch reťazca prebiehala za podmienok podrobne popísaných v kapitole 4.3.2.

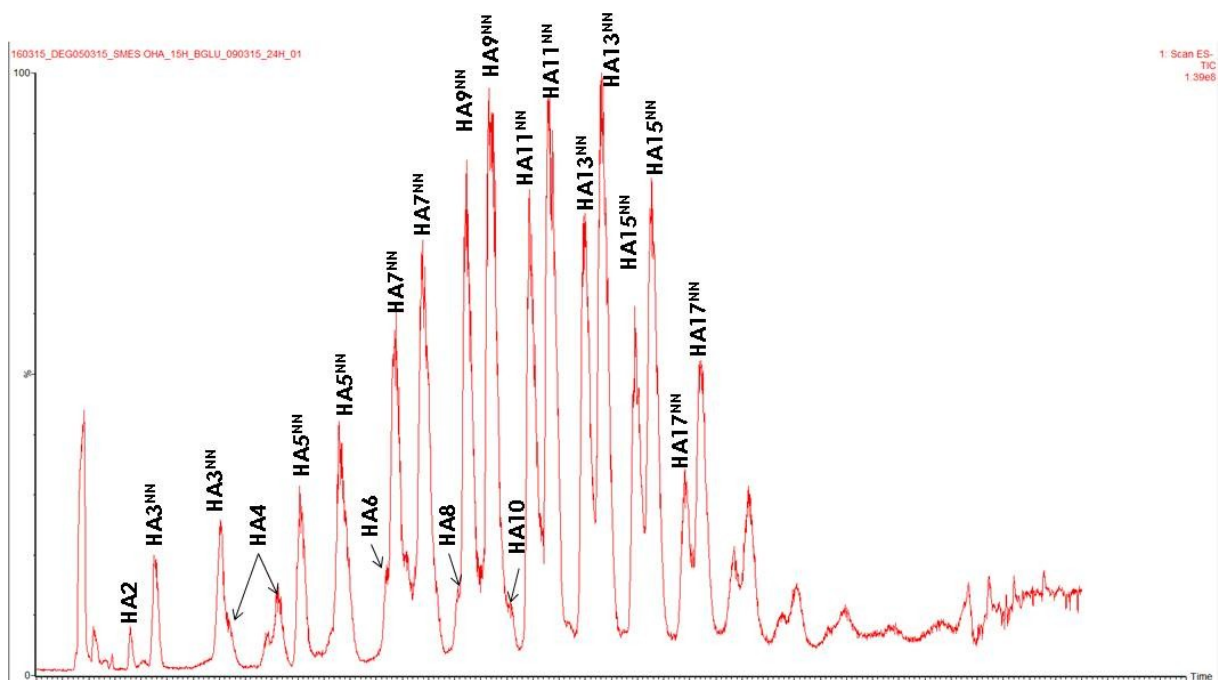


Obrázok 19 Chromatogram pripravenej zmesi párných oligosacharidov HA typu AN enzymatickou degradáciou pomocou BTH. Degradácia prebiehala v tlmivom roztoku o pH 5,4 pri teplote 37 °C 15 hodín, kedy množstvo pridávaného enzýmu bolo 20 U/mg HA.

Pomocou enzýmu BTH bola pripravená zmes oligosacharidov, ktorých koncentračné zastúpenie je možné pozorovať na Obrázok 19. Podarilo sa pripraviť širokú škálu párných oligosacharidov, kde najväčšie koncentračné zastúpenie mali oligosacharidy HA₈ a HA₆. Táto zmes bola následne použitá ako substrát pre nasledujúce enzymatickú hydrolýzu pomocou β -Glukuronidázy.



Obrázok 20 Chromatogram zmesi nepárnych oligosacharidov typu NN a zvyškových AN pripravených enzymatickou degradáciou zmesi párných oligosacharidov pomocou β -Glukuronidázy. (UHPLC), Dĺžka enzymatického štiepenia bola 24 hodín pri teplote 37 °C. Bol pridávaný 1 ml enzýmu o koncentrácii 6 mg/ml.



Obrázok 21 Chromatogram zmesi nepárnych oligosacharidov typu NN a zvyškových AN pripravených enzymatickou degradáciou zmesi párnych oligosacharidov pomocou β -Glukuronidázy. (LC-MS). Dĺžka enzymatického štiepenia bola 24 hodín. Enzymatické štiepenie prebiehalo v tlmivom roztoku o pH 5,4 pri teplote 37 °C.

Chromatogram z UHPLC analýzy poukazuje na to, že sa podarilo pripraviť širokú škálu oligosacharidov HA^{NN} (Obrázok 20), kde najväčšie zastúpenie má oligosacharid HA_7^{NN} . Štruktúra bola overená pomocou metódy LC-MS (Obrázok 21). Jednotlivé oligosacharidy boli identifikované na základe pomeru molekulovej hmotnosti a náboja z hmotnostných spektier.

6 DISKUSIA

Kyselina hyalurónová sa od svojho objavenia uplatnila už v mnohých odvetviach. Na počiatku si našla uplatnenie v pekárenskom priemysle alebo ako náhrada sklovca pri operáciách oka [3]. Neskôršie sa využívala tiež ako výživový doplnok pri osteoartróze [2]. V súčasnej dobe sa používa kyselina hyalurónová v ortopédii, reumatológii, oftamológii alebo napríklad pri vlhkom hojení rán, kde vytvára prostredie a okrem toho sa v rane rozkladá na oligosacharidy s regulačnou funkciou [30]; [53]. Výsadne postavenie si taktiež zachováva v kozmetických aplikáciách.

Je nutné spomenúť aj oligosacharidy kyseliny halurónovej, ktoré, ako sa preukázalo, majú odlišné vlastnosti od natívnej vysokomolekulárnej kyseliny hyalurónovej. Sú známe mnohé postupy ich prípravy prostredníctvom nešpecifickej alebo špecifickej degradácie, ktoré vedú k vzniku rôznych typov oligosacharidov [28]; [11]. Následnou analýzou vzniknutých produktov sa zaoberalo veľa výskumných tímov, ktoré popísali postupy analýzy pomocou rozličných chromatografických metód, kapilárnej elektroforézy prípadne pomocou NMR analýzy [43]; [46]; [48]; [49]; [52]. Použitie oligosacharidov HA sa zameriava najmä na kozmetický priemysel a na budúce uplatnenie v medicínskej oblasti, či už pri liečbe poranení podporou angiogenézy, migráciou fibroblastov alebo ako nosiče liečiv pri liečbe ochorení ako napríklad rakovina [53]; [55]. V týchto dňoch sú už dostupne na trhu rôzne druhy oligosacharidov produkované viacerými firmami ako napríklad Contipro, Lifecore, Induron, Cosmo Bio USA a iné.

Optimalizácia prípravy oligosacharidov v laboratórnom meradle je dôležitým krokom pred uvedením prípravy do väčších objemov. Optimalizácia musí byť efektívna a taktiež ekonomická, najmä kvôli cene enzýmu a ostatných chemikálií ale tiež pre časovú náročnosť.

Experimentálna časť tejto práce sa zaoberá prípravou nepárnych oligosacharidov hyaluronanu s *N*-acetylglukozamínom na oboch koncoch reťazca prostredníctvom enzymatickej katalýzy enzýmom β -Glukuronidáza, kde východiskovým substrátom sú párne oligosacharidy typu AN. Oligosacharidy typu NN nie sú komerčne dostupné a práve tieto oligosacharidy sa môžu v budúcnosti využívať ako materiál pre ďalšie chemické derivatizácie alebo biologické testovanie.

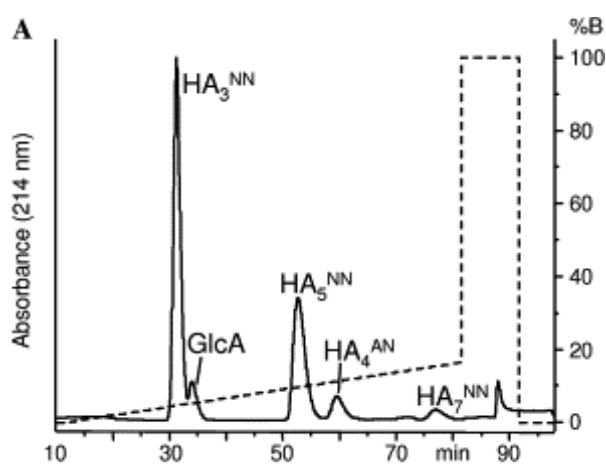
Ťažiskovými bodmi práce bolo optimalizovať podmienky reakcie (pH, teplota) a pripraviť zmes nepárnych oligosacharidov typu NN.

Optimalizáciou podmienok pre enzymatickú hydrolýzu pomocou β -Glukuronidázy bolo zistene, že optimálne pH prostredie pre priebeh reakcie je pH 4 (Obrázok 12). Pri vyššom pH ako 4 dochádzalo k poklesu aktivity enzýmu pravdepodobne zapríčinennej tým, že pH prostredie ovplyvnilo disociáciu ionizovateľných funkčných skupín, ktoré udržiavajú konformáciu enzýmu ale taktiež zodpovedajú za tvorbu komplexu enzým-substrát. Podobnú hodnotu pH predstavili autori Himeno a spol, ktorí stanovili optimálne pH enzýmu izolovaného z hovädzej pečene na 4,4 [25]. Nízke pH reakcie je výhodne pre rutinnú prípravu

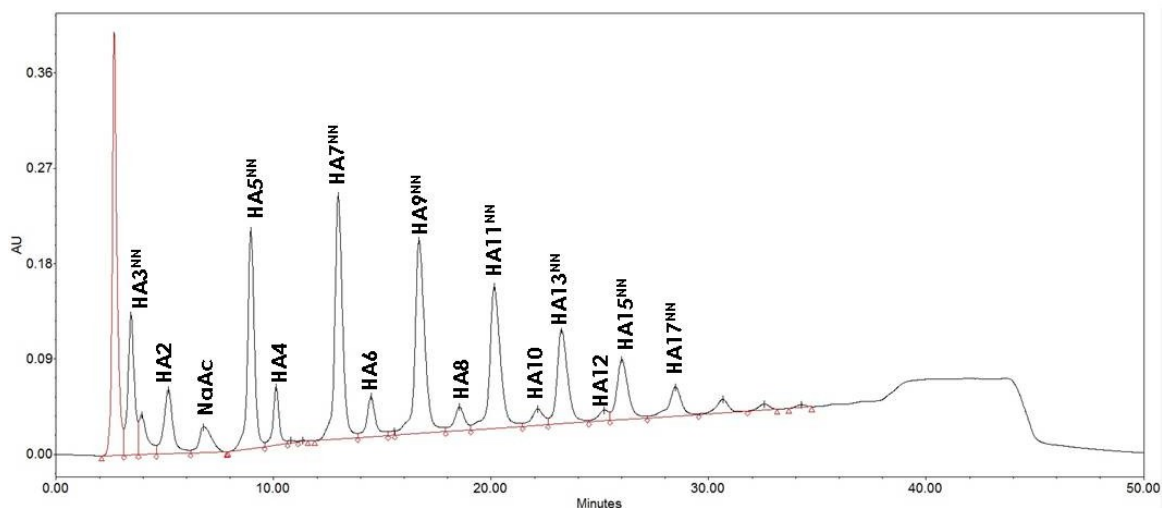
oligosacharidov HA, pretože pri nízkom pH je potlačovaný rast mikroorganizmov a médium sa počas enzymatickej hydrolýzy takzvané „nekazí“, to znamená, že je jednoduchšie udržať mikrobiálnu čistotu média.

Obecne platí, že s rastúcou teplotou rastie rýchlosť enzymatickej reakcie, ale príliš vysoká teplota spôsobuje denaturáciu enzýmu. Zároveň ale platí, že optimálna teplota pre priebeh enzymatickej reakcie závisí na dobe inkubácie substrátu a enzýmu. Dlhšia reakčná doba spôsobuje hlbšie zmeny v štruktúre enzýmu a teda znižuje ideálnu teplotu. V tomto prípade pri reakčnej dobe 4 hodiny bola optimálna teplota stanovená na 55 °C (Obrázok 10). Pri teplote 60 °C a viac došlo k výraznému poklesu aktivity enzýmu zapríčinennej teplotnou denaturáciou, kedy u enzýmu, ktorý má bielkovinovú povahu, došlo k štruktúrnej zmene a práve preto neprebehla premena všetkého substrátu na požadovaný produkt. Pri teplote nižšej ako je optimálnych 55 °C, bolo pozorované spomalenie enzymatickej katalýzy čo malo za následok časť nepremeného substrátu v nami stanovenom časovom úseku.

Obdobným spôsobom ako bola pripravená zmes oligosacharidov hyaluronanu v tejto bakalárskej práci pripravil nepárne oligosacharidy s GlcNAc na oboch koncoch Blundell a Almond (2006). Nepárne oligosacharidy pripravoval pri koncentracii 0,2 kU/mg HA β -Glukuronidázy a dĺžke degradácie 3 h [28]. Množstvo vznikajúcich oligosacharidov HA^{NN} nekvantifikoval, ale obraz o výťažnosti reakcie si je možné urobiť z chromatogramu z IEC analýzy zobrazeného na Obrázok 22 [28]. V tejto práci bola použitá koncentrácia 0,04 kU/mg HA a pri dĺžke trvania enzymatického štiepenia jeden deň bola pripravená široká zmes oligosacharidov typu HA^{NN}, ktoré však obsahovali aj nízke koncentrácie párnych oligosacharidov HA^{AN}. Obraz o výťažnosti pripravenej zmesi je možné si urobiť z chromatogramu z UHPLC metódy zobrazenej na Obrázok 23.



Obrázok 22 Chromatogram purifikácie oligosacharidov HA^{NN} pomocou metódy IEC. Oligosacharidy boli vytvorené z oligomérov typu AN degradáciou pomocou enzýmu β -Glukuronidáza. Prevzaté z [28].



Obrázok 23 Chromatogram zmesi nepárnych oligosacharidov typu NN a zvyškových AN pripravených enzymatickou degradáciou zmesi párnych oligosacharidov pomocou β -Glukuronidázy. (UHPLC), Dĺžka enzymatického štiepenia bola 24 hodín

K dosiahnutiu čo najlepších výťažkov by bolo vhodné optimalizovať aj zloženie média pre degradáciu alebo množstvo dávkovaneho enzýmu. Aj napriek optimalizovaným podmienkam je potrebné získané produkty separovať a purifikovať aby sa docielila požadovaná čistota. Nasledujúcimi krokmi vedúcimi k izolácii čistých oligosacharidov HA^{NN} by mohli byť izolácia oligosacharidov z mobilnej fázy po chromatografickej separácii a sušenie produktu.

7 ZÁVER

V teoretickej časti bakalárskej práce bola naštudovaná literatúra o kyseline hylurónovej, jej degradácií zameranej na enzymatickú katalýzu a tiež spôsoby jej analýzy.

V experimentálnej časti boli stanovené optimálne podmienky pre degradáciu enzymatickou katalýzou pomocou β -Glukuronidázy a bola pripravená zmes oligosacharidov typu HA^{NN} , ktorých štruktúra a zastúpenie boli stanovené inštrumentálnymi metódami.

Pre zvolený čas degradácie (4 hod) boli optimalizované teplota a pH degradačného tlmivého roztoku. Bolo zistené, že za týchto podmienok:

- optimálna teplota je 55 °C
- optimálne pH je 4

Pripravená zmes oligosacharidov HA^{NN} obsahovala široké zastúpenie rôzne veľkých oligosacharidov, kde najväčší podiel bol oligosacharidov HA_7^{NN} . Zmes oligosacharidov bola analyzovaná pomocou metódy LC-MS, čím bola potvrdená ich štruktúra.

8 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1]. MEYER, K., PALMER, J. W.: The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 107, 1934, s. 629-634.
- [2]. STEINBÜCHEL, A., VANDAMME, E. J., BAETS, S. De.: Biopolymers: Polysaccharides I, *Polysaccharides from Prokaryotes*, Volume 5, Wiley-VCH, 2002. 532 strán. ISBN 3-527-30226-3.
- [3]. NECAS, J., BARTOSIKOVA, L., BRAUNER, P., KOLAR, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, Review Article, Volume 53. 2008 (8). s. 397-411.
- [4]. HASCALL, V. C., LAURENT, T. C.: Hyaluronan: Structure and Physical Properties. [HTML dokument]. December 1997, Glycoforum. [citované 6.1.2014]. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [5]. CHONG, B. F., BLANK, L. M., MCLAUGHLIN, R., NIELSEN, L. K.: Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 66, Issue 4, January 2005, s. 341-351, doi:10.1007/s00253-004-1774-4.
- [6]. BROWN, M., JONES, S.: Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, Volume 19, Issue 3, May 2005, s. 308-318.
- [7]. BOERIU, C. G., SPRINGER, J., KOOY, F. K., van den BROEK, L. A. M., EGGINK, G.: Production Methods for Hyaluronan, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, Volume 2013, Article ID 624967, 14 strán. doi:10.1155/2013/624967
- [8]. CHONG, B. F., BLANK, L. M., MCLAUGHLIN, R. and NIELSEN, L. K.: Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology And Biotechnology*, Volume 66, Issue 4, 2005, s. 341–351, ISSN 0175-7598, doi:10.1007/s00253-004-1774-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-004-1774-4>.
- [9]. KIM, J., YOO, S., OH, D., KWEON, Y., PARK, D., LEE, C., GIL, G.: Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 19, Issue 6, 1 November 1996, s. 440-445, ISSN 0141-0229, Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00019-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00019-1).
- [10]. WIDNER, B., BEHR, R., DOLLEN, V., et al.: Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 71, No. 7, July 2005, s. 3747–3752, doi:10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005.
- [11]. STERN, R., KOGAN, G., JEDRZEJAS, M. J., ŠOLTÉS, L.: The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology Advances*, Volume 25, Issue 6, November–December 2007, s. 537-557, ISSN 0734-9750.
- [12]. TOKITA, Y., OKAMOTO, A.: Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. *Polymer Degradation and Stability*, Volume 48, Issue 2, February 1995, s. 269–273, ISSN 0141-3910.

- [13]. DŘÍMALOVÁ, E., VELEBNÝ, V., SASINKOVÁ, V., HROMÁDKOVÁ, Z., EBRINGEROVÁ, A.: Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating. *Carbohydrate Polymers*, Volume 61, Issue 4, 21 September 2005, s. 420-426, ISSN 0144-8617.
- [14]. STERN, R., JEDRZEJAS M. J. The Hyaluronidases: Their Genomics, Structure, and Mechanism of Action. *Chemical review*, vol. 106, 2006, s. 818-839.
- [15]. MEYER, K.: *Hyaluronidases*. Z knihy Boyer P.D.: The enzymes. 1. Vydání, London, Academic Press, 1971, Sv. 5, s. 307-320. ISBN 978-0-12-122705-0.
- [16]. KREIL, G.: Hyaluronidases - a group of neglected enzymes. *Protein Science*, vol. 4, 1995, s. 1666-1669.
- [17]. STERN, R.: Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology*, Volume 83, Issue 7, 2004, s. 317-325, ISSN 0171-9335, <http://dx.doi.org/10.1078/0171-9335-00392>.
- [18]. MENZEL, E. J., FARR, C.: Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Letters*, vol. 131, 1998, s. 3-11, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835\(98\)00195-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(98)00195-5).
- [19]. EL-SAFORY, N. S., FAZARY, A. E., LEE, C.: Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers*, Volume 81, Issue 2, 11 June 2010, s. 165-181, ISSN 0144-8617, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.02.047>.
- [20]. DESCHREVEL, B., TRANCHEPAIN, F., VINCENT, J. C.: Chain-length dependence of the kinetics of the hyaluronan hydrolysis catalyzed by bovine testicular hyaluronidase. *Matrix Biology*, vol. 27, 2008, s. 475-486. doi:10.1016/j.matbio.2008.01.007.
- [21]. OETTL, M., HOECHSTETTER, J., ASEN, I., BERNHARDT, G., BUSCHAUER, A.: Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae* in pharmaceutical preparations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 18, 2003, s. 267-277, doi:10.1016/S0928-0987(03)00022-8.
- [22]. LI, S., JEDRZEJAS, M. J.: Hyaluronan binding and degradation by *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, 2001, s. 407-416. doi: 10.1074/jbc.M106634200.
- [23]. ZOU, S., XIE, L., LIU, Y., KALEEM, I., ZHANG, G., LI, C.: N-linked glycosylation influences on the catalytic and biochemical properties of *Penicillium purpurogenum* β -d-glucuronidase. *Journal of Biotechnology*, Volume 157, Issue 3, 10 February 2012, s. 399-404, ISSN 0168-1656.
- [24]. Sigma-Aldrich: β -Glucuronidase. Sigmaaldrich.com [online]. [cit. 18.4.2015]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/beta-glucuronidase.html>.
- [25]. HIMENO, M., HASHIGUCHI, Y., KATO, K.: β -Glucuronidase of Bovine Liver. *J. Biochem.* Volume 76, No. 6, June 1974, s. 1243-1252.

- [26]. HASSAN, M. I., WAHEED, A., GRUBB, J. H., KLEI, H. E., KOROLEV, S., LY, W. S.: High Resolution Crystal Structure of Human β -Glucuronidase Reveals Structural Basis of Lysosome Targeting. *Plos one*. Volume 8, Issue 11, November 2013
doi:10.1371/journal.pone.0079687.
- [27]. PLAPP, B.V. and COLE, R. D.: Arch. Biochem. *Bio phys.*, Volume 116, 1966, s. 193-206.
- [28]. BLUNDELL, C. D., ALMOND, A.: Enzymatic and chemical methods for the generation of pure hyaluronan oligosaccharides with both odd and even numbers of monosaccharide units. *Analytical Biochemistry*, Volume 353, Issue 2, 15 June 2006, s. 236-247, ISSN 0003-2697.
- [29]. ROTHENHÖFER, M., GRUNDMANN, M., BERNHARDT, G., MATYSIK, F., BUSCHAUER, A.: High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) for the sensitive determination of hyaluronan oligosaccharides. *Journal of Chromatography B*, Volume 988, 15 April 2015, s. 106-115, ISSN 1570-0232.
- [30]. LAPČÍK, L. Jr., LAPČÍK, L., DEMEESTER, J., DE SMEDT, S., CHABRECEK, P.: Hyaluronan: Preparation, Strucuture, Properties and Applications. *Chemical rewiews*, Volume 98, Number 8, December 1998, s. 2663-2684.
- [31]. PRICE, K. N., TUINMAN, A., BAKER, D. C., CHISENA, C., CYSYK, R. L.: Isolation and characterization by electrospray-ionization mass spectrometry and high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides derived from hyaluronic acid by hyaluronate lyase digestion: Observation of some heretofore unobserved oligosaccharides that contain an odd number of units. *Carbohydrate Research*, Volume 303, Issue 3, 26 September 1997, s. 303-311, ISSN 0008-6215.
- [32]. MAHONEY, D. J., et al.: Novel methods for preparation and characterization of hyaluronan oligosaccharides of defined lenght. *Glycobiology*, Volume 11, no. 12, December 2001, s. 1025–1033, doi: 10.1093/glycob/11.12.1025.
- [33]. HOLMBECK, S., LERNER, L.: Separation of hyaluronan oligosaccharides by the use of anion-exchange HPLC. *Carbohydrate Research*, Volume 239, 1 February 1993, s. 239-244, ISSN 0008-6215, [http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)84218-U](http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(93)84218-U).
- [34]. CAPILA, I., SASISEKHARAN, R.: Chapter 2 - Methods for Analysis of Hyaluronan and Its Fragments. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, edited by Hari G. Garg and Charles A. Hales, Elsevier Science Ltd, Oxford, 2004, s. 21-40, ISBN 9780080443829, Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080443829500339>.
- [35]. MAJER, J.: *Analytická chémie: Učebnica pre farmaceutické fakulty*. 1. vyd. Martin: Osveta, 1989, 363 s.
- [36]. MOTYKA, K. A HLAVÁČ, J.: *Stručný přehled separačních metod*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 45 s. ISBN 978-80-244-2304-3.
- [37]. JANDERA, P.: *Kapalinová chromatografie*: [sborník přednášek k semináři]. Pardubice: ČVTS-pobočka VŠCHT, 1979, 242 s.
- [38]. KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*. Druhé, upravené a doplněné vidání, Ostrava 2003, 132 strán, ISBN 80-86369-07-2.

- [39]. WESTON, A., BROWN, P. R.: HPLC and CE: Principles and practice, San Diego: Academic Press, 1997, 280 strán, ISBN 0-12-136640-5.
- [40]. Waters.com. Waters: *High Performance Liquid Chromatography* [online]. © 2015 [cit. 28.4.2015], dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_US/Identifying-and-Quantitating-Compounds/nav.htm?cid=10049064.
- [41]. NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013, 2 sv. (299, 235 s.). ISBN 978-80-260-4243-3.
- [42]. NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2 sv., 299, 2013, 235 s., ISBN 978-80-260-4244-0.
- [43]. ROTHENHÖFER, M., GRUNDMANN, M., BERNHARDT, G., MATYSIK, F., BUSCHAUER, A.: High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) for the sensitive determination of hyaluronan oligosaccharides. *Journal of Chromatography B*, Volume 988, 15 April 2015, s. 106-115, ISSN 1570-0232, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.02.027>.
- [44]. UCHIYAMA, H., DOBASHI, Y., OHKOUCHI, K., NAGASAWA, K.: Chemical Change Involved in the Oxidative Reductive Depolymerization of Hyaluronic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*, Volume 265, No. 14, May 15 1990, s. 7753-7759.
- [45]. VOLPI, N.: On-line HPLC/ESI-MS separation and characterization of hyaluronan oligosaccharides from 2-mers to 40-mers. *Anal Chem*, Volume 79, Issue 16, 2007, s. 6390-7.
- [46]. KÜHN, A. V., RAITH, K., SAUERLAND, V., NEUBERT, R. H. H.: Quantification of hyaluronic acid fragments in pharmaceutical formulations using LC-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 30, Issue 5, January 2003, s. 1531-1537, ISSN 0731-7085, [http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00544-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00544-7).
- [47]. KAŠÍČKA, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chem. Listy*, Roč. 91, č. 5, 1997, s. 320-329, Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_05_320-329.pdf.
- [48]. MACCARI, F., TRIPODI, F., VOLPI, N.: High-performance capillary electrophoresis separation of hyaluronan oligosaccharides produced by *Streptomyces hyalurolyticus* hyaluronate lyase. *Carbohydrate Polymers*, Volume 56, Issue 1, 17 May 2004, s. 55-63, ISSN 0144-8617, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.12.002>.
- [49]. KÜHN, A. V., RÜTTINGER, H. H., NEUBERT, R. H. H. and RAITH, K.: Identification of hyaluronic acid oligosaccharides by direct coupling of capillary electrophoresis with electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, Volume 17, Issue 6, March 2003 s. 576-582, doi: 10.1002/rcm.950.
- [50]. KARAMANOS, N. K., AXELSSON, S., VANKY, P., TZANAKAKIS, G. N., HJERPE, A.: Determination of hyaluronan and galactosaminoglycan disaccharides by high-performance capillary electrophoresis at the attomole level. Applications to analyses of tissue and cell culture proteoglycans. *Journal of Chromatography A*, Volume

- 696, Issue 2, 14 April 1995, s. 295-305, ISSN 0021-9673,
[http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)01294-O](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(94)01294-O).
- [51]. LIPTAJ, T.: *Nukleárna magnetická rezonancia – jadrá atómov v službách chémie a medicíny*. [pdf dokument], [citované 19.1.2015], Dostupný z:
http://www.nmr.sk/uploads/nmr_kniha.pdf.
- [52]. ALKRAD, J. A., MRESTANI, Y., STROEHL, D., WARTEWIG, S., NEUBERT R.: Charakterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. *Jouranl of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 31, 2003, s. 545-550.
- [53]. GAO, F., LIU, Y., HE, Y., YANG, C., WANG, Y., SHI, X., WEI, G. Hyaluronan oligosaccharides promote excisional wound healing through enhanced angiogenesis. *Matrix Biology*, Volume 29, Issue 2, March 2010, s. 107-116, ISSN 0945-053X.
- [54]. STERN, R., ASARI, A. A., SUGAHARA, K. N.: Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*, Volume 85, Issue 8, 3 August 2006, s. 699-715, ISSN 0171-9335, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.05.009>.
- [55]. STERN, R.: Hyaluronidases in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*, Volume 18, Issue 4, August 2008, s. 275-280, ISSN 1044-579X,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.017>.
- [56]. JOURNO-GERSHFELD, G., KAPP, D., SHAMAY, Y., KOPEČEK, J., DAVID, A.: Hyaluronan oligomers-HPMA copolymer conjugates for targeting paclitaxel to CD44-overexpressing ovarian carcinoma. *Pharmaceutical Research*, Volume 29, Issue 4, April 2012, s. 1121-1133, doi: 10.1007/s11095-012-0672-1.
- [57]. KE, C., SUN, L., QIAO, D., WANG, D., ZENG, X.: Antioxidant acitivity of low molecular weight hyaluronic acid. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 49, Issue 10, October 2011, s. 2670-2675, ISSN 0278-6915.

9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

BTH	hovädzia testikulárna hyaluronidáza
BVH	hyaluronidáza včelieho jedu
DAD	detektor diódového poľa
ESI	ionizácia elektrosprejom
GlcA	kyselina glukuronová
GlcNAc	<i>N</i> -acetyl-D-glukozamín
GPC	gélová permeačná chromatografia
GUS	β -Glukuronidáza
HA	kyselina hyalurónová
HA ₄	tetramér kyseliny hyalurónovej
HA ₆	hexamér kyseliny hyalurónovej
HA ₉ ^{NN}	nonamér kyseliny hyalurónovej s <i>N</i> -acetyl-D-glukozamínom na oboch koncoch
HA ₁₀ ^{AN}	dekamér kyseliny hyalurónovej
HA ^{AA}	kyselina hyalurónová s kyselinou glukuronovou na oboch koncoch
HA ^{AN}	kyselina hyalurónová s kyselinou glukuronovou na neredukujúcom a <i>N</i> -acetyl-D-glukozamínom na redukujúcom konci
HA ^{NA}	kyselina hyalurónová s <i>N</i> -acetyl-D-glukozamínom na neredukujúcom a kyselinou glukuronovou na redukujúcom konci
HA ^{NN}	kyselina hyalurónová s <i>N</i> -acetyl-D-glukozamínom na oboch koncoch
HAS	hyaluronansyntáza
HPCE	vysokoúčinná kapilárna elektroforéza
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
Hyal	hyaluronidáza
IEC	ión výmenná chromatografia
LC-MS	kvapalinová chromatografia s hmotnostným detektorom
LWMHA	nízkomolekulárna kyselina hyalurónová
MALDI	ionizácia laserom za účasti matrice
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostný spektrometer
NMR	nukleárna magnetická rezonancia

OHA	oligosacharidy kyseliny hyaluronovej
PDA	detektor diódového poľa
RP-LC	kvapalinová chromatografia na reverzných fázach
RP-LC-MS	kvapalinová chromatografia na reverzných fázach s hmotnostným detektorom
THF	tetrahydrogénfurán
UHPLC	ultra-účinná kvapalinová chromatografia
UV	ultrafialová oblasť
UV-VIS	ultrafialová-viditeľná oblasť svetla